

Mira Hartikainen, Tiina Huuhtanen

Nanokokoisen rautaoksidin genotoksisuuden määritys komeetta- ja mikrotumamenetelmillä *in vitro*

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

30.10.2014

Tekijät	Mira Hartikainen, Tiina Huuhtanen
Otsikko	Nanokokoisen rautaoksidin genotoksisuuden määrittäminen komeetta- ja mikrotumatesteillä <i>in vitro</i>
Sivumäärä Aika	46 sivua + 8 liitettä 30.10.2014
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Hannele Pihlaja, lehtori Saila Pesonen, asiantuntija
<p>Nanomateriaalit mahdollistavat täysin uudenlaista teknologiaa. Niitä käytetään esimerkiksi paperissa, kemikaaleissa ja kosmetiikassa, joten ne liittyvät yhä useampien ihmisten jokapäiväiseen elämään. Nanomateriaalien tutkimuksella pyritään erottamaan vaarattomien joukosta terveydelle haitalliset materiaalit, jotta esimerkiksi nanomateriaalien parissa työskentelevien työolosuhteita voidaan kehittää entistä turvallisemmiksi.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia nanokokoisen rautaoksidin mahdollisia genotoksisia vaikutuksia ihmisen keuhkoepiteelisoluissa <i>in vitro</i>. Työ toteutettiin Työterveyslaitoksen nanoturvallisuuskeskuksessa. Se on osa BRASINOEU -projektia, jonka tarkoituksena on tutkia nanomateriaalien turvallisuutta. Tavoitteena oli saada luotettavat tulokset mahdollisista genotoksista vaikutuksista <i>in vitro</i>.</p> <p>Opinnäytetyössä käytettiin BEAS 2B- keuhkoepiteelisoluja, jotka viljeltiin ja altistettiin kahdeksalla eri pitoisuudella nanokokoista rautaoksidia. Näytteet analysoitiin komeettamenetelmällä, jolla arvioidaan solun DNA-vauriota ja mikrotumamenetelmällä, jolla nähdään onko solulle aiheutunut kromosomivauriota.</p> <p>Saadut tulokset viittaavat siihen, että nanokokoinen rautaoksidi saattaa aiheuttaa vaurioita sekä DNA:ssa että kromosomeissa suuremmilla altistuspitoisuuksilla. Pidemmällä altistusaikalla on mahdollisesti merkitystä genotoksista vaikutusta lisäävänä tekijänä.</p> <p>Jotta voidaan tehdä lopulliset johtopäätökset nanokokoisen rautaoksidin mahdollisista haitallisista vaikutuksista, on jatkotutkimuksena tehtävä <i>in vitro</i> -kokeet ainakin kerran. Lisäksi koe-eläimillä tehtävät <i>in vivo</i> -kokeet ovat välttämättömiä.</p>	
Avainsanat	mikrotumamenetelmä, komeettamenetelmä, soluviljely, nanokokoinen rautaoksidi, nanomateriaalit

Authors	Mira Hartikainen, Tiina Huuhtanen
Title	Genotoxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles with Comet and Micronucleus Assays <i>in vitro</i>
Number of Pages Date	46 pages + 8 appendices 30 October 2014
Degree	Bachelor of Healthcare
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Saila Pesonen, Specialist
<p>Engineered nanomaterials enable the use of completely new technological advances. Nanomaterials are used, for example in pulp, paper, chemicals and cosmetics. Thus, nanomaterials are part of our daily life. Nanomaterial research is aiming to ensure the safe use of nanomaterials by distinguishing the ones that might be harmful to both end users of the products and people working with the materials. By these research findings safety measures could be set accordingly.</p> <p>The purpose of our study was to examine the possible genotoxic effects of iron oxide nanoparticles in human bronchial epithelial cells <i>in vitro</i>. The study was carried out at the Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland and it is a part of a project called BRASINOEU. The aim of BRASINOEU is to examine the safety of nanomaterials. The aim of our study was to get reliable information about the possible genotoxic effects of iron oxide nanoparticles <i>in vitro</i>.</p> <p>In our study we used BEAS 2B human bronchial epithelial cells. The cells were cultured and exposed to 8 different concentrations of nanosized iron oxide. The samples were analyzed by using comet assay to determine the possible DNA damage, and micronucleus assay to determine the possible chromosomal damage.</p> <p>Our findings indicate that iron oxide nanoparticles may cause damages both in DNA and chromosomes at higher doses of exposure in BEAS 2B cells <i>in vitro</i>. Longer exposure time seems to be increasing the possible genotoxic effect.</p> <p>To achieve reliable results more <i>in vitro</i> studies should be performed. For making final conclusions about the possible genotoxic effects of iron oxide nanoparticles also <i>in vivo</i> studies are necessary.</p>	
Keywords	micronucleus assay, comet assay, cell culture, iron oxide nanoparticles, nanomaterials

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Nanomateriaalit	2
2.1	Nanokokoinen rautaoksidi	5
2.2	Nanokokoiselle rautaoksidille altistuminen	6
3	Soluviljely, komeetta- ja mikrotumamenetelmät	7
3.1	Soluviljelyn periaatteet	7
3.2	Komeettamenetelmän periaate	9
3.3	Mikrotumamenetelmän periaate	13
3.4	Fluoresenssimikroskopia	16
4	Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset	17
5	Opinnäytetyön toteutus	17
5.1	Soluviljely	18
5.2	Solujen altistaminen	20
5.3	Komeettamenetelmän toteutus	23
5.4	Mikrotumamenetelmän toteutus	26
6	Työn tulokset	29
6.1	Komeettamenetelmä	29
6.2	Mikrotumamenetelmä	32
7	Tulosten tarkastelu ja pohdinta	35
7.1	Tulosten tarkastelu	35
7.2	Luotettavuuden arviointi	37
7.3	Jatkotutkimukset	40
7.4	Lopuksi	41
	Lähteet	43

Liitteet

Liite 1. Nanokokoisien rautaoksidin sytotoksisuustulokset

Liite 2. Altistuksessa käytetyt laimennokset

Liite 3. Nanokokoisien rautaoksidin DLS-tulokset

Liite 4. Työvaiheiden aikataulutus ja solujen altistamisen pipetointikaavio

Liite 5. Komeettamenetelmän työohje ja materiaalit

Liite 6. Mikrotumamenetelmän työohje

Liite 7. Komeettamenetelmän numeeriset tulokset

Liite 8. Mikrotumamenetelmän numeeriset tulokset

1 Johdanto

Nanomateriaalien käyttö on lisääntynyt runsaasti viimeisten vuosien aikana ja käytön ennustetaan lisääntyvän entisestään lähitulevaisuudessa, sillä nanomateriaalit mahdollistavat pienen kokonsa vuoksi täysin uudenlaista teknologiaa. Niitä hyödynnetään muun muassa kemikaaleissa, lääketeollisuudessa, paperin valmistuksessa sekä energian ja kulutustavaroiden tuotannossa. (Vogel ym. 2014: 1-3.)

Lisääntyneen käytön vuoksi nanomateriaaleille altistutaan yhä useammin, ja useissa kokeellisissa tutkimuksissa on pystytty yhdistämään nanomateriaalit lukuisiin terveydellisiin uhkiin (Vogel ym. 2014: 9). Nanomateriaalien tutkimuksessa pyritäänkin selvittämään mitkä nanomateriaaleista ovat terveydelle haitallisia sekä millaisille hiukkasille ja pitoisuuksille yleisimmin altistutaan (Savolainen - Vainio 2011: 1103; Hurme 2011).

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Työterveyslaitoksen Nanoturvallisuuskeskukselle, joka tutkii nanohiukkasten terveysvaikutuksia, arvioi nanohiukkasille altistumista työpaikoilla, auttaa työpaikkojen nanomateriaalien käytön riskienhallinnassa sekä tarjoaa nanomateriaaleihin liittyvää tietoa (Työterveyslaitos). Työn ohjaajina toimivat Työterveyslaitoksen asiantuntija Saira Pesonen sekä Metropolia Ammattikorkeakoulun lehtori Hannele Pihlaja.

Työn aihe on osa suurempaa kansainvälistä tutkimusprojektia nimeltään Translocation and Safe Design of Surface Engineered Metal Oxide Nanoparticles (suom. Teollisesti suunniteltujen metallioksidin nanopartikkelien sijoittuminen (elimistössä) ja turvallinen suunnittelu), josta käytetään lyhennettä BRASINOEU. Projektissa työskentelee kansainväliset tutkimusryhmät seuraavilla osa-alueilla: immunologia, genotoksikologia, nanopartikkeleiden valmistus, pintakemia, biofysiikka, kuvantaminen sekä materiaalitiede. Tämä opinnäytetyö sijoittuu genotoksikologian osa-alueelle.

BRASINOEU -projektin tarkoituksena on tutkia nanomateriaalien turvallisuutta, sillä nanomateriaalien käytön ja tuotannon lisääntyessä tarvitaan yhä syvempää tietämystä nanomateriaalien ja niiden tuotannon vaikutuksista ihmisten terveyteen. Se perustuu Safe by Design -konseptiin, jossa pyritään vähentämään ja estämään nanomateriaalien mahdollisia haittavaikutuksia ihmisiin sekä ympäristöön jo niiden suunnittelusta alkaen.

BRASINOEU käsittää monien metallioksidinapartikkeleiden ominaisuuksien tutkimisen biologisissa tutkimusmateriaaleissa *in vitro* sekä *in vivo*.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää nanokokoisen rautaoksidin mahdollisia genotoksisia eli perimää vaurioittavia vaikutuksia keuhkoepiteelisoluille. Työn kokeellinen osuus koostui soluviljelyvaiheesta, altistamisvaiheesta ja analyysivaiheesta. Viljelty BEAS 2B -keuhkoepiteelisolut altistettiin eri pitoisuuksilla nanokokoista rautaoksidia ja analysoitiin komeetta- ja mikrotumamenetelmillä. Komeettamenetelmää käytetään nanomateriaalien mahdollisesti aiheuttaman solun DNA-vaurion arvioimiseen (Catalán 2014: 262). Mikrotumamenetelmällä taas selvitetään mahdollisia kromosomivaurioita (Fenech 2007: 1084).

2 Nanomateriaalit

Nanohiukkasesta puhuttaessa tarkoitetaan ainehiukkasista, jonka koko on alle 100 nanometriä, eli noin miljoonasosa millimetristä (Savolainen - Vainio 2011: 1097). Euroopan komissio määritteli vuonna 2011 nanomateriaalit seuraavalla tavalla: Luonnollinen, sivutuotteena tai teollisesti valmistettu materiaali, joka sisältää partikkeleita vapaina, ryhmittyneinä tai kasautuneina ja jossa partikkeleista vähintään 50 prosenttia lukumääräperusteisen kokojakauman mukaisesti on kooltaan 1-100 nm tai jonka ulkomitoista yksi tai useampi on 1-100 nm (Euroopan komissio 2011).

Kiinnostus nanohiukkasista kohtaan heräsi 1980-luvulla. 2000-luvun alkupuolelle mennessä nanoteknologiasta oli tullut nopeasti kehittyvä ja laajeneva koulukunta, ja uusia nanomateriaaleja kehitettiin ja löydettiin lisää. Nanomateriaalien nopeasti lisääntyvä käyttö johtuu niiden erityispiirteistä: nanomateriaalit ovat pieniä, reaktiivisia, sähköä johtavia ja ne pystyvät muodostamaan vastustavia, kestäviä, reaktiivisia ja itsestään puhdistuvia pintoja. (Vogel ym. 2014: 18-60.)

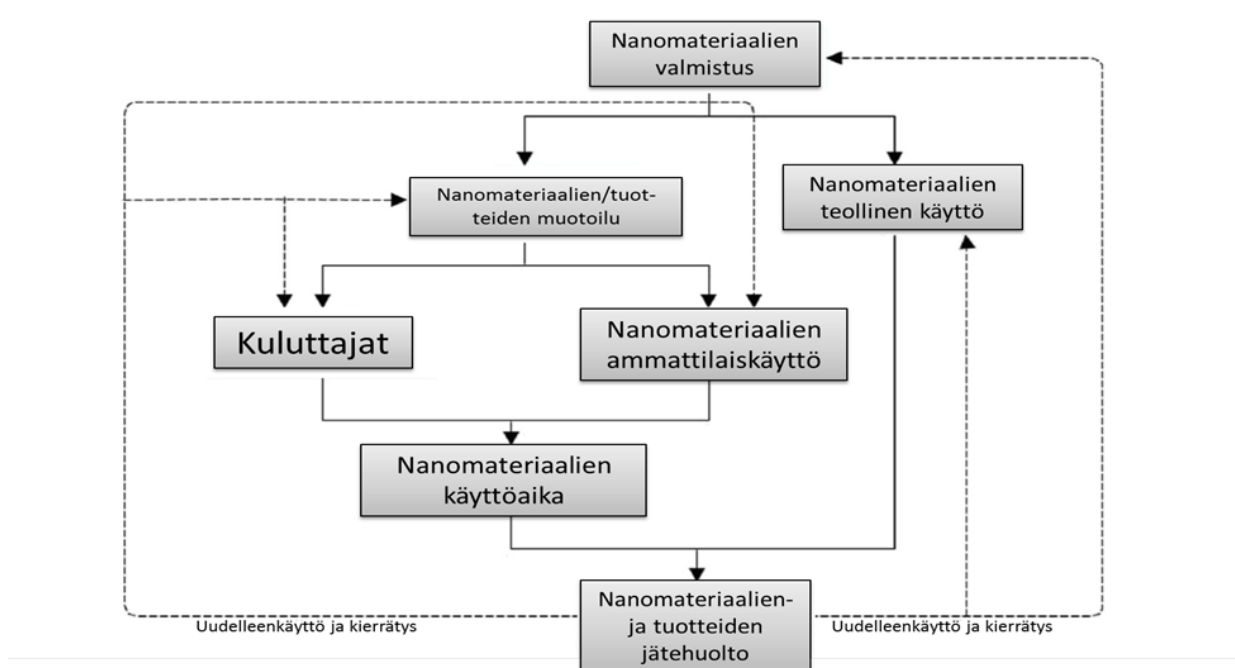
Nanomateriaalit ovat ainutlaatuisia, sillä niiden käyttäytyminen ja fysikokemialliset ominaisuudet eroavat täysin saman yhdisteen suurempiin partikkeleihin verrattuna (Catalán – Suhonen – Huk – Dusinska 2014: 242). Mitä pienempi hiukkasen koko on, sitä suurempi on sen tilavuuden ja pinta-alan suhde. Tämä tarkoittaa sitä, että yhä suurempi osa hiukkasen molekyyleistä tai atomeista sijaitsee sen pinnassa. Mitä suurempi pinta-ala verrattuna tilavuuteen jollakin tietyllä aineella on, sitä herkemmin se reagoi

biomolekyylien, esimerkiksi nukleiinihappojen kanssa. (Savolainen - Vainio 2011: 1099.) Mutta juuri ne ominaisuudet, jotka tekevät nanohiukkasista teknologisesti arvokkaita, ovat myös niitä ominaisuuksia, jotka saattavat aiheuttaa mahdollista haittaa ihmisille ja ympäristölle (Vogel ym. 2014: 60).

Todennäköisyys altistua nanohiukkasille on kasvanut, mikä johtuu suunniteltujen, teollisesti kehitettyjen nanohiukkasten käytön nopeasta kasvusta (Vogel ym. 2014: 6). Työelämässä altistumista voi tapahtua erityisesti niillä työpaikoilla, joissa ei tiedetä tarpeeksi nanohiukkasten terveysvaikutuksista (Savolainen - Vainio 2011: 1098-1099). Toisaalta, altistuminen ei koske ainoastaan työelämää, vaan se koskee myös satoja miljoonia kuluttajia (Hurme 2011), sillä esimerkiksi monet kosmetiikkatuotteet sisältävät nanopartikkeleita (Teknokemian yhdistys ry).

Työpaikoilla työntekijät altistuvat nanomateriaaleille tuotannon kaikissa vaiheissa. Uutta materiaalia kehitettäessä altistusmäärät ovat yleensä pieniä. Tuotantovaiheessa altistumista voi tapahtua valmistuksen, pakkaamisen, kuljetuksen ja varastoinnin yhteydessä. Käsiteltävän materiaalin määrät ovat yleensä jo suuria ja altistuminen todennäköisempää. Tuotantovaiheen jälkeen joitakin nanomateriaaleja hyödynnetään osana muita tuotteita tai niitä käytetään muissa prosesseissa raaka-aineena. Altistuminen on mahdollista myös näissä jatkoprosesseissa. Altistumista voi tapahtua vielä siinäkin vaiheessa, kun materiaalia hävitetään. Teollisesti valmistetuille nanomateriaaleille on siis mahdollista altistua kaikissa nanomateriaalien elinkaaren vaiheissa. Näitä vaiheita esitellään kuviossa 1. (Vogel ym. 2014: 30-32.)

Nanomateriaalien kaikkia terveysvaikutuksia ei vielä tiedetä tarkasti, sillä nanokoossa materiaalien eri ominaisuudet muuttuvat merkittävästi ja uusia sovellutuksia nanomateriaaleille kehitetään jatkuvasti (Työterveyslaitos). Nanohiukkasista suurin osa on täysin haitattomia, mutta haasteena ja yhtenä nanomateriaalien tutkimuksen tarkoituksena on tunnistaa haitalliset nanohiukkaset ja niiden mahdolliset vaikutukset ihmisiin. Eläinkokeissa ne on yhdistetty lukuisiin uhkiin. Mahdollisia nanomateriaalien aiheuttamia terveyshaittoja ovat keuhkotulehdus, keuhkojen arpeutuminen sekä vaikutukset verenkiertoelimistöön, perimään ja aivoihin. Ne voivat myös mahdollisesti aiheuttaa syöpää. (Hurme 2011.)



Kuvio 1. Nanomateriaalien elinkaari Vogel ym. (2014: 32) mukaan.

Syöpä voi syntyä solujen kasvun, solunjakautumisen tai perimän eheyttä ylläpitävien geenien toiminnan häiriöistä eli syynä syövän syntyyn ovat vauriot perimässä, geeneissä (Laiho 2002: 1751). Nanopartikkeleiden aiheuttama genotoksisuus eli perimän vaurioituminen voi olla seurausta partikkeleiden suorasta vaikutuksesta DNA:han tai solujen lisääntyneestä partikkelien aikaansaamasta reaktiivisten happiradikaalien tuotannosta. Lisääntynyt happiradikaalien tuotanto voi aiheuttaa oksidatiivisen stressin, jonka kuvataan olevan nanopartikkelien avainmekanismi DNA-vaurioiden aiheuttamisessa. Solut kykenevät korjaamaan nanopartikkeleiden aiheuttamia DNA-vaurioita, mutta jos vauriot korjataan väärin tai ne jäävät korjaamatta, ovat replikaatiovirheet sekä mutaatiot geeneissä tai kromosomeissa mahdollisia. (Catalán ym. 2014: 242-243.)

Yksi tärkeistä näkökulmista nanomateriaalien tutkimisessa on myös se, että niiden pinnan rakennetta voidaan muokata, jotta voidaan löytää tapoja lisätä niiden biologista yhteensopivuutta ja kontrolloida niiden sijoittumista niin solun, kuin koko elimistönkin tasolla. Tutkimalla erilaisia pintakemiallisia ratkaisuja on kehitetty uusia sovellutuksia nanomateriaaleille. Ja mikä on tärkeää, myös pinnan muokkauksessa käytettävän materiaalin tulee olla haitatonta, jotta näitä ainutlaatuisia nanomateriaaleja pystyttäisiin hyödyntämään turvallisesti. (Gupta – Gupta 2005: 3995.)

2.1 Nanokokoinen rautaoksidi

Raudan toksiset vaikutukset ovat kiinnostuksen kohteena kolmesta syystä: rauta on ihmiselimistön ja luonnon runsain siirtymäalkuaine, mikro- ja nanokokoisia rautaoksidi- ja hyödynnetään runsaasti teollisuudessa ja rautaionit voivat aiheuttaa vapaiden radikaalien syntymistä (Freyria ym. 2012: 850). Mikäli vapaita radikaaleja syntyy ihmisen kestäkykyä enemmän, voivat ne aiheuttaa oksidatiivisen stressin, jolloin vapaat radikaalit muuttavat haitallisesti lipidejä, proteiineja ja DNA:ta, aiheuttaen näin lukuisia sairauksia (Lobo – Patil – Phatak – Chandra 2010). Ilmassa esiintyvät rautahiukkaset vaihtelevat kooltaan useista mikrometreistä muutamiin satoihin nanometreihin, ja niitä voidaan löytää niin työperäisistä ympäristöistä, kuin kaupunki-ilmastostakin (Freyria, ym. 2012: 850).

Nanokokoisien rautaoksidin käytetyimmät muodot ovat magnetiitti (Fe_3O_4), maghemiitti ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ja hematiitti ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Yhteistä näille kolmelle on kristallimainen ulkomuoto, joka edesauttaa niiden magneettisia ominaisuuksia. Ne ovatkin erityisenä mielenkiinnon kohteena magneettisten ominaisuuksiensa vuoksi. Niillä on potentiaalinen käyttö-tarkoitus nanolääketieteessä kontrastin välittäjänä magneettikuvauksessa. Tällä tekniikalla voisi olla mahdollista nähdä syöpä jo entistä aikaisemmassa vaiheessa. Kontrastin välittäjinä niistä voisi olla hyötyä myös *in vivo* tutkimuksessa, jos on mahdollista saavuttaa spesifinen kontrasti eri elimille tai kudoksille. (Teja – Koh 2009: 22-28.)

Nanokokoista rautaoksidia ja sen erilaisia pintakemiallisia ratkaisuja on hyödynnetty monien muidenkin *in vivo* sovellutusten tutkimisessa. Näistä esimerkkeinä ovat syövän hoitoon liittyvä hypertermiahoito, jonka tarkoituksena on hajottaa kasvaimia lämmön avulla, immunologiset menetelmät, biologisten nesteiden puhdistus, kudosten korjaus sekä lääkkeiden spesifinen kuljetus. (Gupta – Gupta 2005: 3995; Teja – Koh 2009: 28.)

Muun muassa Rozgaj ym. (2014) sekä Singh ym. (2013: 56) ovat tutkineet nanokokoisien rautaoksidin genotoksisuutta rotissa *in vivo* käyttäen komeetta- ja mikrotumamenetelmiä. Molemmissa tutkimuksissa on tultu johtopäätökseen, ettei nanokokoinen rautaoksidi aiheuta genotoksisia vaikutuksia. Battacharya ym. (2012: 179) taas selvitti tutkimuksessaan nano- ja mikrokokoisten partikkeleiden genotoksisuutta *in vitro* käyttämällä komeettamenetelmää. Tutkimuksessa huomattiin, että nanokokoinen rautaoksidi oli genotoksista BEAS 2B – keuhkoepiteelisoluilla. Genotoksisia vaikutuksia voitiin kuitenkin

kin huomata vasta kun pitoisuus oli 50 µg/ml tai enemmän. Työterveydellisesti merkittävillä pitoisuuksilla, alle 10 µg/ml, ei huomattu olevan genotoksisia vaikutuksia.

2.2 Nanokokoiselle rautaoksidille altistuminen

Nanokokoisien rautaoksidille, kuten muillekin suunnitelluille nanohiukkasille, altistutaan useimmin työpaikoilla hengittämällä ilmassa leijailuvia nanopartikkeleita. Altistumista voi joissakin tapauksissa tapahtua myös ihon ja ruoansulatuselimistön kautta. (Vogel ym. 2014: 28.)

Nanomateriaalit päätyvät keuhkoihin hengitysilman välityksellä (Vogel ym. 2014: 28). Päästäkseen solujen sisälle nanopartikkeleilla on useita eri keinoja riippuen niiden koosta, muodosta, kemiallisesta koostumuksesta ja pinnanmuodoista. Edellä mainitut ominaisuudet vaikuttavat myös siihen, kuinka helposti kyseinen nanopartikkeli pääsee solun sisään. Esimerkiksi nanopartikkelit, jotka ovat kooltaan 50 nanometriä, pääsevät solun sisälle helpommin, kuin sitä pienemmät tai suuremmat partikkelit. Jopa saman nanomateriaalin partikkeleita voi päätyä solun sisään monin eri tavoin. (Kettiger – Schipanski – Wick – Huwyler 2013: 3256.)

Päästäkseen solun sisään nanopartikkelien on kyettävä läpäisemään solun sisä- ja ulkopuolen erottava solukalvo. Yleensä tämä tapahtuu aktiivisesti hyödyntäen fagosytoosia ja pinosytoosia. Solun sisälle otetut nanopartikkelit ohjataan yleisimmin endosomaalista reittiä joko takaisin solun pinnalle, tai kohti lysosomia. Jotkin nanopartikkelit kykenevät kuitenkin pakenemaan endosomista vapautuen solulimaan ja voivat aiheuttaa siellä vapaiden happiradikaalien syntymistä sekä oksidatiivisen stressin. Lisäksi nanopartikkelit voivat vaurioittaa muita soluelimiä, kuten mitokondrioita ja tumaa. (Kettiger – Schipanski – Wick – Huwyler 2013: 3257-3261.)

Bhattacharya ym. (2012: 177) tekemässä tutkimuksessa havaittiin mikro- ja nanokoisten rautaoksidahiukkasten kerääntyvän BEAS 2B- keuhkosoluihin mitokondrioiden läheisyyteen. Partikkeleita ei kuitenkaan löytynyt mitokondrioista tai tumasta. Nanopartikkeleiden löytyminen mitokondrioiden läheisyydestä voi kuitenkin johtaa suoraan tai epäsuoraan oksidatiivisen stressin vaikutukseen myös mitokondrioissa.

Eräiden teollisesti valmistettujen metallioksidinanomateriaalien on havaittu kulkeutuvan keuhkoista verenkiertoelimistöön. Rautaoksidahiukkasten on osoitettu heikentävän

hiussuonien verenkiertoa useissa elimissä ja häiritsevän sekä sydämen toimintaa, että välittäjäaineiden toimintaa verenkiertoelimistössä. Verenkierrosta metallioksidit kerääntyvät pääasiassa maksaan ja pernaan. (Vogel ym. 2014: 9-10.)

Ruansulatusteiden merkitys nanokokoisten metallioksidien päätymisessä elimistöön on melko vähäinen verrattuna hengitysteihin. Tällä reitillä imeytymiseen vaikuttaa muun muassa partikkelikoko, sillä mitä pienempi partikkeli sitä paremmin se imeytyy. Imeytymisessä on eroja myös eri materiaalien välillä. Iholle joutuessaan metallioksidinapartikkelit, kuten rautaoksidi, voivat imeytyä osittain ihon läpi, yleensä kuitenkin pääsemättä verenkiertoon asti. (Vogel ym. 2014: 10.)

Nanokokoiset rautahiukkaset kykenevät myös kulkemaan nenän hajuepiteeliä pitkin aivoihin, hyödyntämällä aksonaalista kuljetusta. Vaikka nanokokoiset rautahiukkaset eivät voi läpäistä veri-aivoestettä eivätkä näin pysty kulkeutumaan aivoihin verenkierron mukana, voivat ne silti kulkeutua useisiin aivojen eri osiin hajuepiteelin kautta. (Savolainen - Vainio 2011: 1100-1101.)

3 Soluviljely, komeetta- ja mikrotumamenetelmät

Yleisimmät menetelmät nanomateriaalien genotoksisuuden tutkimuksessa ovat komeetta- ja mikrotumamenetelmät (Landsiedel ym. 2009). Tämä luku esittelee edellä mainitut menetelmät ja molempiin tiiviisti liittyvät soluviljelyn ja fluoresenssimikroskopian.

3.1 Soluviljelyn periaatteet

Soluviljely menetelmänä perustuu solujen viljelyyn suotuisissa olosuhteissa, kunnes ne ovat vieneet lähes kaiken vapaan tilan kasvualustaltaan. Kasvutilan täyttyessä solut siirrostetaan, eli siirretään uuteen kasvatusastiaan, jossa niillä on tuoretta kasvatusliuosta ja lisää tilaa jatkaa kasvua. Viljelyolosuhteet vaihtelevat laajasti solutyypistä riippuen. Kaikilla soluilla on kuitenkin oltava niille sopiva kasvualusta eli astia ja kasvatusliuos, joka tarjoaa soluille ravintoaineita, kasvutekijöitä, hormoneja, kaasuja, sekä säätelee ympäristön pH:ta, osmoottista painetta ja lämpötilaa. (Life Technologies: 2: 26).

Viljeltävät solut vaativat hoitoa. Soluille on säännöllisesti vaihdettava tuoretta kasvatusliuosta ja kasvutilan täytyttyä solut on siirrostettava. Koska solut käyttävät aineenvaihdunnassaan kasvatusliuksessa olevia ainesosia, on niitä tarjottava soluille säännöllisesti lisää, ennen kuin ne loppuvat tai heikentyvät vanhassa kasvatusliuksessa. Neljä tekijää ilmaisee milloin kasvatusliuos olisi aiheellista vaihtaa: pH:n muutos, solumäärä, solutyyppi ja solumorfologian muuttuminen. (Freshney 2005: 205.)

Kasvatusliuksessa on pH-indikaattori: kun soluviljelyssä käytetyn kasvatusliuksen väri muuttuu punaisesta oranssiin ja keltaiseen, on pH laskenut ja kasvatusliuos on syytä vaihtaa. Solumäärältään suuret viljelmät käyttävät kasvatusliuksessa olevat ravintoaineet nopeammin kuin pienet viljelmät, joten ne vaativat tiheämpää kasvatusliuksen vaihtoväliä. Tavallisesti solut lopettavat kasvunsa kasvutekijöiden loputtua kasvatusliuksesta, mutta jatkuvien solulinjojen solut muuttuvat nopeasti huonovointisiksi ja kuolevat ellei kasvatusliuksen vaihtoa ja siirrostusta tehdä tarpeeksi usein. Solumorfologian tarkastelu on tärkeää, jotta solujen mahdollisesti alkava kuoleminen huomataan ajoissa. (Freshney 2005: 205.)

Siirrostusta solut tarvitsevat kun ne vievät lähes kaiken vapaan tilan kasvatusalustaltaan, eli kasvavat lähes konfluenttina sekä silloin, kun kasvatusliuosta täytyy vaihtaa entistä useammin ja kun edellisestä siirrostuksesta on kulunut aikaa. Ihanteellisesti siirrostus tehtäisiin 7 päivän välein, ja kasvatusliuksen vaihto 3-4 päivän välein. (Freshney 2005: 207-208.)

Jotkin solut vaativat, että ne ovat kiinnittyneitä kasvualustaansa (adherentit ja yksisolukerrosviljelmät), kun taas toiset voivat kasvaa suspensiossa ilman kiinteää alustaa. Kiinteältä alustalta solut saadaan irrotettua joko mekaanisesti tai entsyymien, kuten trypsiinin ja trypsiini/EDTA:n, avulla. (Life Technologies: 19; Freshney 2005: 184.) Trypsiini toimii proteaasina hajottaen proteiinisidoksia joilla solut ovat kiinnittyneet kasvualustaansa. Jotkin soluja kiinnittävät proteiinit tarvitsevat toimiakseen kalsiumia, jolloin kalsiumia kelatoivaa EDTA:ta käytetään irrottamaan nämä proteiinit. Solujen altistusaika trypsiinille on pyrittävä minimoimaan, jotta solut eivät kuole. Trypsiinin vaikutus voidaan pysäyttää lisäämällä trypsiinikäsiteltujen solujen päälle seerumia sisältävää kasvatusliuosta. (Freshney 2005: 184-185.)

Normaalisti solut voivat jakautua vain rajallisen määrän. Solulinjalla tarkoitetaan solupopulaatiota, joka voi jakautua käytännössä katsoen ikuisesti. Jotta tämä olisi mahdol-

lista, täytyy solulinjan käydä läpi muodonmuutos. Tämä voi tapahtua joko spontaanisti tai se voidaan aiheuttaa esimerkiksi kemiallisesti tai virusten avulla. Tällaisen, niin kutsutun jatkuvan solulinjan, hyötyinä ovat nopea jakautuminen ja kuolemattomuus. (Life Technologies: 2; Freshney 2005: 41-204.)

Onnistuneen viljelyn takaamiseksi soluja on estettävä kontaminaatioilta. Mahdollisia kontaminantteja ovat esimerkiksi bakteerit, sienet ja virukset. Aseptisella työtavalla estetään steriilin soluviljelyn kontaminoituminen ympäristön mikro-organismien kanssa, sillä useimmat ympäristön mikro-organismit kasvavat viljelmissä nopeammin kuin eläinsolut. Aseptisen työskentelytavan keinoja ovat steriili työskentely-ympäristö, hyvä henkilökohtainen hygienia, steriilit reagenssit ja kasvualustat, sekä steriili käsittelytapa. (Life Technologies: 11-12; Freshney 2005: 2.)

Työskentely tapahtuu laminaarivirtauskaapissa, jolloin vältetään pölyltä ja huoneilman aiheuttamalta solujen kontaminaatiolta. Tärkeää on, että työskentely-ympäristö pidetään siistinä ja puhtaana. Pinnat desinfioidaan ennen aloitusta ja työskentelytilassa pidetään vain niitä välineitä ja tarvikkeita joita sillä hetkellä tarvitaan. Mikäli nesteitä läikkyä työskentelypinnalle, puhdistetaan ne välittömästi pois. Reagenssi- ja kasvatusainepullot tulee pyyhkiä alkoholilla ennen niiden asettamista laminaarivirtauskaapiin, eikä korkkeja saa avata kaapin ulkopuolella. Lisäksi soluviljelypullojen aika lämpökaapin ulkopuolella pyritään minimoimaan ja pipetoimiseen käytetään vain pipettejä, joissa on suodatin. (Freshney 2005: 73-80.)

3.2 Komeettamenetelmän periaate

Komeettamenetelmällä tarkoitetaan yksittäisen solun geelielektroforeesi menetelmää (Single Cell Gel Electrophoresis Assay). Sitä käytetään laajalti nanomateriaalien aiheuttaman DNA-vaurion arvioimiseen solusta ja se on käytetyin menetelmä nanomateriaalien genotoksisuuden määrittämisessä. (Catalán ym. 2014: 242.)

In vitro komeettamenetelmä ei kuulu OECD:n (Organisation for Economic Cooperation and Development, suom. Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö) kansainvälisiin ohjeistuksiin genotoksisuuden määrittämiseen validoiduista menetelmistä. Komeettamenetelmä on kuitenkin validoitu useissa eurooppalaisissa projekteissa sekä erityisesti nanopartikkeleiden genotoksisuuden määrittämiseen esimerkiksi NanoGenotox -projektissa. Automatisaation sekä tehokkuutensa vuoksi sitä pidetään yhtenä lupaa-

vimmista menetelmistä nanomateriaalien genotoksisuuden tutkimisessa. (Catalán ym. 2014: 262.) Mutta yleisen standardin puuttuminen vaikeuttaa laboratorioden välistä tulosten vertailua (Ersson 2011: 3).

Komeettamenetelmän optimaalisin versio genotoksisuuden arvioimiseen on alkaliversio ($\text{pH} > 13$), jonka ensimmäisen version on kehittänyt Singh ym. vuonna 1988. Muihin genotoksisuuden määrittämiseen kehiteltyihin menetelmiin verrattuna se on herkkä havaitsemaan myös pieniä DNA-vaurioita, se vaatii vain hyvin pienen määrän soluja näytettä kohden, on joustava, edullinen, helppo sekä nopea menetelmä. (Tice ym. 2000: 206.) Menetelmästä voidaan myös muokata monia erilaisia sovellutuksia, kuten tiettyjen DNA-alueiden vaurioiden määrittäminen, solujen DNA-korjauskapasiteetin ja DNA-DNA-siltojen mittaaminen sekä geenispesifisen DNA-vaurion mittaaminen yhdistettynä fluoresenssi *in situ* hybridisaatio (FISH) -menetelmään. Muokkaamisessa voidaan käyttää esimerkiksi entsyymikäsittelyjä. (Ersson 2011: 2.)

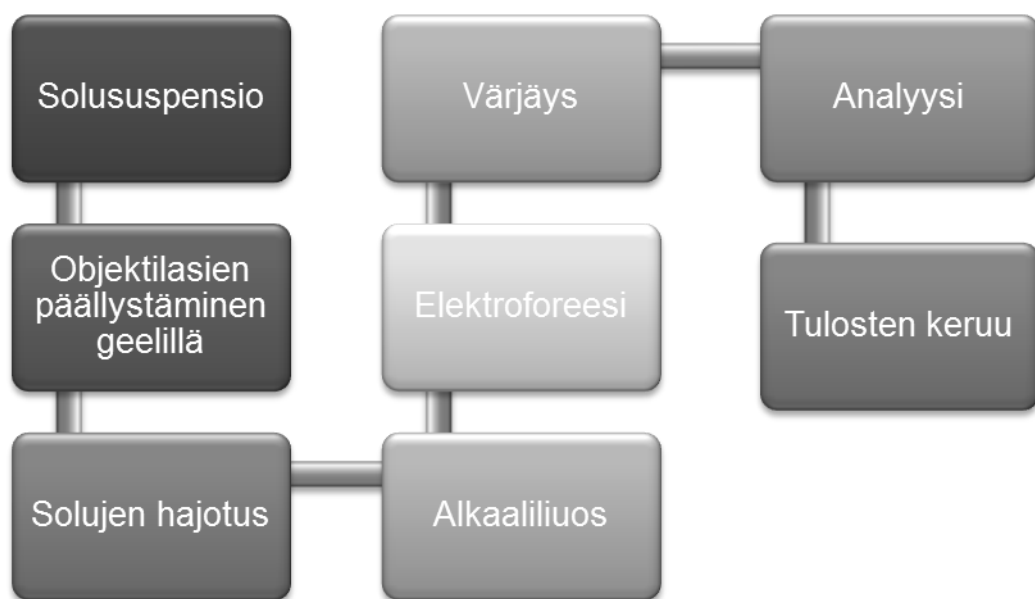
In vitro komeettamenetelmässä käytetään viljeltyjä soluja, jotka altistetaan tutkittavalle materiaalille kyseessä olevaan tutkimukseen sopivilla pitoisuuksilla ja altistusajoilla. Käytännössä mitä tahansa tumallista solua voidaan käyttää. Solulinjan valintaan vaikuttaa tutkittava materiaali, tutkimuksen päämäärä, altistustapa sekä kohde-elin tai -kudos. *In vitro* komeettamenetelmässä voidaan käyttää primaarisoluja tai useita ihmisen tai nisäkkään solulinjoja, yleisimmin iho-, veri-, aivo-, keuhko- tai maksasoluja tai ruuansulatuskanavan soluja. (Catalán ym. 2014: 245-256.)

In vitro tutkimuksiin kemikaaleilla 3-6 tunnin altistus on suositeltavinta, mutta nanopartikkelien genotoksisuuden arvioimiseen tulisi käyttää myös pidempää 24 tunnin altistusta, sillä komeettamenetelmällä voidaan tutkia myös vaurioiden korjautuvuutta. Solut omaavat korjausentsyymejä, jotka korjaavat nopeasti lähes kaikki vauriot ennen pysyvien perimän vaurioiden syntymistä. Tutkimusmateriaalilla altistettujen solujen DNA-vaurioiden korjautuvuutta voidaan arvioida tarkastelemalla jäljelle jääneiden vaurioiden määrää eri aikapisteissä. Jotkin nanopartikkelit saattavat myös tarvita pidemmän altistusajan päästäkseen solun sisään. (Azqueta – Shaposnikov – Collins 2011: 615-617; Catalán ym. 2014: 245.)

Solujen altistuksessa käytettävien suspensioiden pitoisuudet tulisi olla samankaltaisia, kuin mahdollisissa altistustapauksissa. *In vitro* tutkimuksissa jokaisen pitoisuuden eloon jäävien solujen osuus tulisi olla vähintään 60 %, sillä liian suuri sytotoksisuus eli

soluja vaurioittava vaikutus, voi myös aiheuttaa DNA-vaurioita ja näin ollen vääriä positiivisia tuloksia. (Catalán ym. 2014: 245.) Altistuksessa käytettäviä pitoisuuksia tulisi olla ainakin kolme (Tice ym, 2000: 213).

Lyhyesti sanottuna komeettamenetelmässä objektilasilla olevat agaroosigeeliin sekoitetut solut hajotetaan ja DNA erotetaan elektroforeesilla. Vaurioitunut DNA liikkuu kohti anodia, muodostaen hännän. Solut värjätään DNA-spesifisellä värillä ja havainnointi tapahtuu fluoresenssimikroskoopin avulla. (Azqueta ym. 2011: 616.) Menetelmän työvaiheita on kuvattu kuviossa 2. Työvaiheet tulee suorittaa keltaisen valon alla. Keltainen valo ehkäisee UV-säteilyn aiheuttamia DNA-vaurioita. (Catalán ym. 2014: 259.)



Kuvio 2. Komeettamenetelmän peruseriaate lyhyesti Ersson (2011: 8) perusteella.

Ensimmäisessä vaiheessa objektilasit päällystetään agaroosigeelillä. Näin saadaan aikaan yhtenäiset geelit, jotka ovat riittävän tasaisia näytteiden analysointiin ja jotka varmistavat solujen hyvän näkyvyyden pienentäen taustahäiriötä. (Tice ym. 2000: 208.) Komeettamenetelmässä käytetään kirkkaita objektilaseja taustahäiriön minimoimiseksi (Ersson 2011: 9). Agaroosikerroksia lasille laitetaan yhteensä yhdestä kolmeen. Esi-valmistelluille, geelillä päällystetyille, kuivatuille objektilaseille pipetoidaan agaroosiin sekoitettua, tutkittavalla materiaalilla altistettua solususpensiota. Solujen määrä sekä agaroosigeelin oikea konsentraatio ovat molemmat tärkeitä tekijöitä onnistuneen analyysin varmistamiseksi. Solujen päälle voidaan vielä tarvittaessa lisätä yksi agaroosikerros. (Tice ym. 2000: 208.)

Kun solususpensio on pipetoitu objektilaseille, ne laitetaan kylmään hajotusliuokseen, joka hajottaa solukalvon ja vain vaurioitunut DNA vapautuu solun ulkopuolelle. Hajotusliuoksen sisältö vaihtelee tutkimusten välillä. Pääasiallinen sisältö on kuitenkin suoloja ja detergenttejä. Hajotusliuoksen kylmyys perustuu tasaisen geelin ylläpitämiseen. Hajotusajan pituus vaihtelee tutkimusten välillä ja solutyypin mukaan alle tunnista jopa kuukausiin. (Tice ym. 2000: 208-209.)

Hajotuksen jälkeen näyte altistetaan alkaliliuokselle, jonka pH on tärkeää olla yli 13, jotta DNA:sta saadaan yksijuosteista (Tice, ym. 2000: 209). Kun pH on korkea, negatiivisesti varautuneet hydroksidi-ionit kykenevät irrottamaan vetyioneja molekyyleistä, esimerkiksi DNA:n emäspareista. Tämä heikentää vetysidoksia, jotka pitävät kaksijuosteista DNA:ta yhdessä, saaden juosteet eroamaan kahdeksi yksijuosteiseksi DNA:ksi. (Brennan 2014.) DNA:n yksijuosteisuus on tärkeää, jotta yhdessä DNA-juosteessa tapahtuva katkeaminen (single-strand break) saadaan paremmin esiin. Lisäksi osa vaurioista tapahtuu DNA:n kohdissa jotka ovat epävakaita alkalien eli korkean pH:n läsnä ollessa (alkali-labile site). (Tice ym. 2000: 209-210.)

Näytteissä mahdollisesti oleva vaurioitunut DNA erotellaan geelielektroforeesilla, jonka puskurina toimii sama alkaliliuos ($\text{pH} > 13$) kuin edellisessä vaiheessa. Elektroforeesissa käytettävä jännite on tyypillisesti 0,7-1,0 V/cm. Vaurioitunut DNA liikkuu elektroforeesin aikana sähkövirran avulla solun perään niin sanotuksi hännäksi. Solusta tulee komeetan muotoinen, mistä menetelmä on saanut nimensä. (Tice ym. 2000: 210.)

Elektroforeesin päätyttyä alkalinen vaikutus neutralisoidaan neutralisointipuskurilla (Tice ym. 2000: 210). DNA värjätään fluoresoivalla värillä, esimerkiksi etidiumbromidilla, jonka jälkeen näytteet mikroskopoidaan. Värjäyksessä voi käyttää etidiumbromidin sijasta myös SYBR Greeniä tai SYBR Safea. Mutta vaikka etidiumbromidi on hyvin myrkyllistä, sillä saadaan aikaan tasaisempi värjäystulos. (Catalán ym. 2014: 269.) Neutralisaation jälkeen lasit voidaan myös kuivattaa ja säilyttää valolta suojattuna myöhemmin tapahtuvaa analysoimista varten (Tice ym. 2000: 210).

Ennen analysointia lasit tulisi koodata, eli tehdä tunnistamattomaksi, numeroimalla ne yksittäin. Analysoijan ei tule tietää mikä koodi vastaa mitään näytettä. Tällä lisätään menetelmän objektiivisuutta. (Tice ym. 2000: 211.)

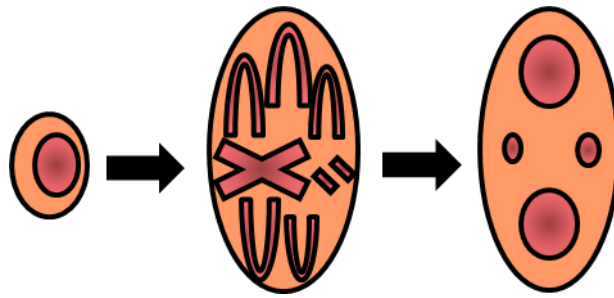
Tulokset kerätään yleisimmin solujen analysointiin suunnitellulla tietokoneohjelmalla. Solut analysoidaan fluoresenssimikroskoopilla, johon on yhdistetty kamera. Kamera analysoi yksittäisten komeettasolujen kuvat automaattisesti. (Catalán ym. 2014: 269.) Useimmin mitattavat määreet ovat se, kuinka pitkälle DNA on liikkunut ja suhteellinen osuus DNA:sta syntyneessä hännässä. Ohjelmat laskevat määreille numeerisia arvoja kuvien perusteella. Saadut tulokset tulisi varmistaa tilastollisilla analyyseillä. (Tice ym. 2000: 211-214.) Tulokset voidaan kerätä myös visuaalisesti (Azqueta ym. 2011: 617).

Komeettamenetelmän toiminta tulisi aina varmistaa sekä positiivisilla että negatiivisilla kontroleilla. Negatiivisena kontrollina käytetään tutkittavaa materiaalia sisältämätöntä liuosta, jota on työstetty samalla tavalla, kuin tutkittavaa materiaalia. Positiivisena kontrollina voi käyttää käytännössä mitä tahansa ainetta, jonka tiedetään aiheuttavan DNA-vaurioita. Valintaan vaikuttaa muun muassa tutkimuksen tarkoitus sekä tutkittava materiaali. Yleisimmin käytetty positiivinen kontrolli on vetyperoksidi (H_2O_2). (Catalán ym. 2014: 246.) Lisäksi jokaisesta tutkitusta pitoisuudesta tulisi tehdä rinnakkaiset näytteet sekä jokaisesta näytteestä rinnakkaiset objektilasit luotettavien ja kattavien tulosten takaamiseksi (Tice ym 2000: 213).

3.3 Mikrotumamenetelmän periaate

Mikrotumamenetelmää eli solunjakautumista estävää mikrotumamenetelmää (Cytokinesis-block micronucleus assay, CBMN) käytetään mittaamaan DNA-vaurioita, sytotoxisuutta ja sytostaasia. (Fenech 2007: 1084.) Mikrotumamenetelmä on OECD:n hyväksymä menetelmä kemikaalien testaamiseen (OECD 2012: 1).

Mikrotuma muodostuu, kun kromosomin osa, tai koko kromosomi jää tuman jakautumisessa jälkeen (Fenech 2007: 1084). Kromosomin, tai sen osien jälkeen jääminen johtuu korjaamattomista, tai väärin korjatuista DNA-vaurioista. Tiedetään, että mikrotumat muodostuvat pääosin asentrisistä eli sentromeerittömistä kromosomifragmenteista, tai kokonaisista kromosomeista, jotka epäonnistuvat tytärkromosomiin yhdistymisessä telofaasin loppuvaiheessa. Nämä ulkopuolelle jääneet kromosomit tai kromosomifragmentit ympäröidään lopulta tumakalvolla ja ne muistuttavat morfologialtaan läheisesti tumaa (Kuvio 3). Mikrotumamenetelmällä pystytään havaitsemaan kromosomivaurioita ja -lukumäärämuutoksia aiheuttavia kemikaaleja soluissa, jotka ovat kertaalleen jakautuneet altistuksen aikana tai sen jälkeen. (Fenech ym. 2011; 125-126 OECD 2012: 1.)



Kuvio 3. Mikrotuman syntyminen Fenech (2007: 1084) perusteella.

Mikrotumamenetelmää voidaan myös käyttää mittaamaan tumasilloja (nucleoplasmic bridge, NPB) ja tumasillalla kiinni olevia mikrotumia (nuclear bud, NBUD). Tumasillat toimivat biomarkkerina disentrisille kromosomeille, eli kromosomeille joissa on kaksi sentromeeria. Disentriset kromosomit muodostuvat telomeerien yhteensulautumisesta tai väärinkorjatuista DNA-vaurioista. Tumasillalla kiinni olevat mikrotumat toimivat biomarkkerina geenien amplifikoitumisessa eli lisämonistuksessa. (Fenech 2007: 1084; Stimpson - Matheny - Sullivan 2012.)

Mikrotumamenetelmässä viljellyt ja altistetut solut kerätään ja niistä tehdään objektilaseille valmisteet. Lasit voidaan valmistaa joko sytosentrifugoimalla ja fiksoimalla lasit, tai tiputtamalla objektilaseille hypotonisesti käsiteltyä ja fiksoitua solususpensiota. Hypotoninen käsittely ei ole välttämätöntä, mutta se saa soluliman väljemmäksi, ja mahdollistaa mikrotumien paremman havaitsemisen. Fiksaation avulla pyritään säilyttämään solujen solulima ja solukalvon rajat, sekä vähentämään kasautumista. Lasien valmistamiseen voidaan käyttää useita tekniikoita, kunhan valmisteet ovat laadultaan hyviä. Valmiit lasit voidaan värjätä useilla eri väreillä, esimerkiksi fluoresoivilla DNA-spesifisillä väreillä, kuten DAPI:lla (4',6-diamidino-2-phenylindole) ja akridiinioranssilla. (Aardema – Kirsch-Volders 2001: 174; OECD 2012: 9; Kirsch-Volders ym. 2000: 169; Life Technologies.)

Mikrotumamenetelmässä kertaalleen jakautuneet solut ovat tunnistettavissa niiden kaksitumaisuuden perusteella. Tämä johtuu siitä, että solunjakautuminen on pysäytetty sytokalasiini B:llä. Sytokalasiini B:ta lisättäessä on otettava huomioon, että se lisätään ennen kuin solut etenevät mitoosiin, jolloin saadaan vain kertaalleen jakautuneita soluja. Kahdesti jakautuneissa soluissa mikrotumia ei yleensä löydy yhtä paljon. (Fenech 2007: 1084-1093.) Sytokalasiini B toimii aktiini-inhibiitorina, joka estää tytärsolujen irtautumisen toisistaan mitoosin jälkeen, muodostaen näin kaksitumaisen solun (Minissi ym. 1999 43; OECD 2012: 4-5). Sytokalasiini B:n lisäämisen jälkeen solujen keräys

ajoitetaan niin, että kaksitumaisten solujen määrä pyritään maksimoimaan ja yksi- ja monitumaisten määrä minimoimaan (Fenech 2007: 1090).

Analysointi tapahtuu valo- tai fluoresenssimikroskoopilla laskemalla jokaisesta pitoisuudesta 2000 kaksitumaista solua. Tämä tarkoittaa 1000 solua viljelmää kohden, kun pitoisuudesta on tehty kaksi rinnakkaista näytettä. (Fenech 2000: 84; OECD 2012: 9-10.) Kaksitumaisten laskukriteerit Fenech ym. (2003: 68-70) mukaan ovat seuraavat:

1. Solussa on kaksi tumaa.
2. Kaksitumaisen solun molempien tumien tumakalvojen on oltava ehjiä ja niiden on sijaittava saman soluliman alueella.
3. Molempien tumien on oltava samankokoisia ja värjädyttävä samalla tavalla.
4. Kaksitumaisen solun tumat saattavat olla kiinnittyneitä toisiinsa tumasillalla, joka ei saa olla leveämpi kuin yksi neljäsosaa suurimman tuman halkaisijasta.
5. Kaksitumaisen solun tumat saavat koskettaa, mutta eivät saisi mennä toistensa päälle. Solun, jossa tumat menevät päällekkäin saa laskea ainoastaan silloin, kun molempien tumien rajat on selvästi erotettavissa.
6. Kaksitumaisen solun soluliman tai solukalvon raja on ehjä ja selvästi erotettavissa rinnakkaisista soluista.

Mikrotumien osuus lasketaan 2000 kaksitumaisesta solusta (OECD 2012: 9). Kriteerit mikrotumallisille kaksitumaisille soluille ovat Fenechin (2003: 70) mukaan seuraavat:

1. Mikrotuman koko vaihtelee 1/16 ja 1/3 tuman koosta.
2. Mikrotumat ovat pyöreitä tai ovaalinmuotoisia.
3. Mikrotumat eivät taita valoa, joten ne ovat helposti erotettavissa artefaktoista.
4. Mikrotumat eivät ole yhteydessä tumaan.
5. Mikrotumat voivat koskettaa tumaa, mutta eivät saa mennä tuman päälle. Mikrotuman tumakalvo pitää olla erotettavissa tuman tumakalvosta.
6. Mikrotumat värjäytyvät yleensä yhtä voimakkaasti kuin tumat, joskus värjäytyminen voi olla voimakkaampaa.

Lisäksi jokaisesta pitoisuudesta lasketaan yksi-, kaksi- ja monitumaisten määrä sytotoksisuuden ja solujen jakautumisaktiivisuuden määrittämiseksi. Fenechin (2007: 1092) käyttämät kriteerit yksi-, kaksi- ja monitumaisten laskemiseen:

1. Yksi-, kaksi- ja monitumaiset solut ovat eläviä soluja, joissa on ehjä sytoplasma ja joissa tuman morfologia on normaali. Soluissa voi olla yksi, kaksi tai useampi tuma.

2. Solut voivat sisältää yhden tai useamman mikrotuman, tumasilloilla kiinni olevia mikrotumia, ja kaksi- tai monitumaisten ollessa kyseessä, yhden tai useamman tumasillan.
3. Nekroottisia ja apoptoottisia soluja ei lasketa mukaan.

Yksi-, kaksi- ja monitumaisten määrä lasketaan, jotta saadaan tietoa elossa olevien solujen jakautumisaktiivisuudesta. Näin ollen saadaan tietoa myös testattavan aineen sytotoksisista vaikutuksista. Jotta tämä voidaan luotettavasti määrittää, tulisi jokaisesta pitoisuudesta laskea 500 solua. Tumien jakautumisaktiivisuus, proliferaatio- eli CBPI-indeksi (cytokinesis-block proliferation index) lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$CBPI = \frac{\text{yksitumaisten määrä} + 2 * \text{kaksitumaisten määrä} + 3 * \text{monitumaisten määrä}}{\text{laskettujen solujen määrä}}$$

Alin mahdollinen arvo on 1, joka tarkoittaa, että solut eivät ole jakautuneet kertaakaan, eli ne ovat yksitumaisia. Mikäli kaikki solut ovat onnistuneet jakautumaan kerran, ja ovat kaksitumaisia, arvo on 2. Arvo voi olla yli 2 ainoastaan silloin, kun solut ovat jakautuneet useammin, kuin kaksi kertaa. (Fenech 2007: 1094; OECD 2012: 5-22.)

Positiivista kontrollia tarvitaan, jotta voidaan varmistaa testin herkkyys tunnistaa kromosomivaurioita ja -lukumäärämuutoksia aiheuttavia tekijöitä. Positiivisena kontrollina käytetään ainetta, jonka tiedetään aiheuttavan mikrotumien syntymistä. Positiivisina kontrolleina voivat toimia esimerkiksi mitomysiini C, aktinomysiini D ja kadmiumsulfaatti. Negatiivinen kontrolli tulisi tehdä jokaisen testin yhteydessä. Negatiivisena kontrollina voidaan käyttää esimerkiksi solujen kasvatusliuosta, joka ei ole soluille syto- tai genotoksista. Negatiivinen kontrolli osoittaa, että käytetty kasvatusliuos ei aiheuta soluille vaurioita. (Migliore – Di Bucchianico – Uboldi 2014: 91-92.)

3.4 Fluoresenssimikroskopia

Molemmissa tässä luvussa käsitellyissä menetelmissä näytteiden analysointiin käytetään fluoresenssimikroskopiaa. Fluoresenssimikroskopia perustuu kemiallisiin yhdisteisiin eli fluorokromeihin, joiden avulla tutkittavasta materiaalista voidaan tarkastella kiinnostuksen kohteena olevia ominaisuuksia. Näkymätön ultraviolettisäteily absorboituu fluorokromeihin, jotka vapauttavat osan säteilystä näkyvinä valon aallonpituuksina, eli fluoresenssina. Valon säteet ohjataan suodattimeen, joka päästää läpi vain käytetylle

fluorokromille ominaisen aallonpituuden. Valo kohdistetaan näytteeseen, jossa näkymätön valon aallonpituus muuttuu näkyväksi aallonpituudeksi. Kohdat, joissa fluorokromia on, näkyvät kirkkaan värisinä tummaa taustaa vasten. (Solunetti 2006.)

4 Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset

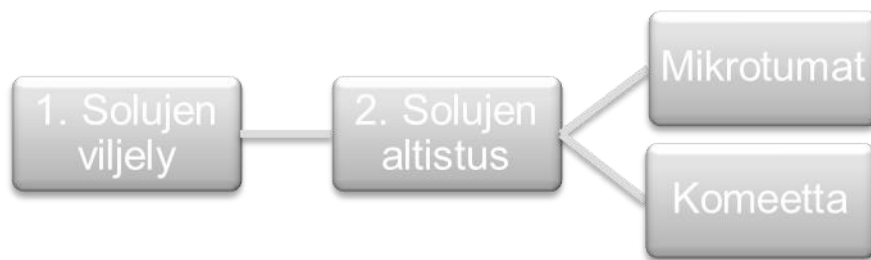
Tämän opinnäytetyön aiheena oli nanokokaisen rautaoksidin genotoksisuuden määrittäminen komeetta- ja mikrotumamenetelmillä *in vitro*. Työn kokeellinen osuus tehtiin ihmisen keuhkoepiteelisoluilla käyttäen päällystämätöntä nanokokaisen rautaoksidin magneetti- γ -Fe₂O₃) muotoa. Aihe on yksi osa nanokokaisen rautaoksidin genotoksisuuden arviointia. Jotta lopullisista tuloksista koskien nanokokaisen rautaoksidin genotoksisuutta saadaan kattavat ja luotettavat, tutkimusprojektiin kuuluu myöhemmässä vaiheessa hiirissä tehtävät *in vivo* -tutkimukset ja *in vitro* -kokeiden toisto.

Tarkoituksena oli selvittää nanokokaisen rautaoksidin mahdollisia genotoksisia vaikutuksia *in vitro* ja näiden tulosten perusteella pohtia millainen vaikutus materiaalilla mahdollisesti on ihmisten terveyteen erityisesti työterveyden kannalta. Oletuksena oli, ettei nanokokainen rautaoksidi ole erityisen genotoksista ja että materiaalin haitallisuus kasvaa pitoisuuden kasvaessa. Tavoitteena oli saada luotettavat tulokset mahdollisista genotoksista vaikutuksista. Tutkimuskysymyksiksi asetettiin seuraavat:

- Aiheuttaako nanokokainen rautaoksidi DNA-vaurioita ihmisen keuhkoepiteelisoluille *in vitro*?
- Aiheuttaako nanokokainen rautaoksidi kromosomivaurioita ihmisen keuhkoepiteelisoluille *in vitro*?
- Onko altistuksen pituudella vaikutusta vaurioiden voimakkuuteen?

5 Opinnäytetyön toteutus

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus tehtiin Työterveyslaitoksen Nanoturvallisuuskeskuksessa syksyllä 2014, viikkojen 35–38 aikana. Työn ohjauksesta vastasi asiantuntija Saira Pesonen. Lisäksi ohjaamiseen osallistui tutkija Kukka Aimonen. Tarvittaessa apua tarjosivat myös tutkimusryhmän muut jäsenet. Tämä luku esittelee opinnäytetyön kokeellisen osuuden, joka koostui kuviossa 4 esitellyistä vaiheista.



Kuvio 4. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden toteutuksen päävaiheet

5.1 Soluviljely

Opinnäytetyössä käytettiin BEAS 2B -keuhkoepiteelisoluja, jotka oli tilattu American Type Culture Collectionilta (ATCC). BEAS 2B -keuhkoepiteelisolut ovat adherentteja, adenovirus 12-SV40 virushybridillä muokattuja ja kloonattuja ihmisen keuhkoepiteelisoluja. Soluja säilytetään pakastettuna nestetyössä. Toteutukseen valittiin keuhkoepiteelisolut, sillä nanomateriaalien yleisin reitti elimistöön on hengitettynä keuhkojen kautta.

Soluampulli nostettiin nestetyöstä ja solut sulatettiin mahdollisimman nopeasti $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vesihauteessa. Sulatettu solususpensio siirrettiin putkeen ja lisättiin kasvatusliuosta (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, BEGM). Putki sentrifugoitiin, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja lisättiin pieni määrä BEGM:a soluille. Solut siirrettiin T75-viljelypulloon ja lisättiin lopullinen tilavuus BEGM:a.

Viljelypullo siirrettiin lämpökaappiin, jossa oli lämpötilana $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja lisäksi 5 % hiilidioksidolosuhteet. Näillä olosuhteilla pyrittiin luomaan soluille mahdollisimman paljon niiden luonnollista kasvuympäristöä vastaavat kasvuolosuhteet. Viljelylämpötila valitaan sen elion mukaan, josta solut on eristetty eli ihmisen soluilla $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hiilidioksidi on läsnä pH-tasapainon ylläpitämistä varten. (Freshney 2005: 115.) Aikataulullisista syistä tämä työvaihe oli tehty valmiiksi ennen työn kokeellisen osan aloitusta. Myöhemmin tässä työssä puhuttaessa solujen siirtämisestä lämpökaappiin, ovat lämpökaapin olosuhteet aina samat kuin yllämainitut.

Soluille vaihdettiin BEGM 2-3 päivän viljelyn jälkeen kun BEGM oli muuttunut kellertäväksi ja roskaiseksi. Vanha BEGM poistettiin, tilalle lisättiin tuoretta BEGM:a ja pullo

siirrettiin takaisin lämpökaappiin. Tuore BEGM sisältää solujen tarvitsemia ravintoaineita, joiden avulla ne voivat jatkaa jakautumistaan.

Kun solut täyttivät 80–90 % kasvualustastaan, ne jaettiin kasvamaan eli siirrostettiin uusiin viljelypulloihin. Soluviljelyn jakokertojen lukumäärää seurattiin jakonumerolla (passage number), joka kasvoi yhdellä numerolla jokaisella jakokerralla ja merkittiin aina uuteen soluviljelypulloon jaon yhteydessä. Jakokertojen lukumäärää on tärkeää seurata, sillä korkean jakonumeron soluviljelmät eivät välttämättä ole laadultaan yhtä hyviä kuin alemman jakonumeron viljelmät. Laadukkaiden kokeiden suorittamista varten on viljeltyjen solujen oltava laadultaan hyviä. (ATCC 2010.) Tässä työssä käytettyjen solujen jakonumero oli p46.

Siirrostuksessa soluilta poistettiin vanha BEGM ja solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (Phosphate Buffered Saline, PBS). Pesun jälkeen soluille lisättiin trypsiiniä (Trypsiini-EDTA 1x) solujen irrottamiseksi kasvualustastaan. Solupullot siirrettiin lämpökaappiin kunnes solut olivat irronneet. Vaikutusaika riippuu käytetystä muovista, solulinjasta sekä trypsiinistä. Pienemmällä T25-viljelypullolla vaikutusaika oli kuusi minuuttia ja isommalla T75-pullolla 10 minuuttia. Trypsiinin vaikutus pysäytettiin käyttämällä seerumillista kasvatusliuosta (RPMI 1640, jossa 10 % Fetal Bovine Serum, FBS). Solut kerättiin putkeen, joka sentrifugoitiin. Supernatantin poiston jälkeen lisättiin tarvittava määrä BEGM:a ja valmis solususpensio jaettiin puhtaisiin viljelypulloihin. BEGM:n määrä riippuu jaettavien solujen lukumäärästä ja uusien viljelypullojen koosta. Solujen lukumäärä laskettiin Bürkerin kammiossa mikroskoopin avulla. Siirrostuksen jälkeen solut siirrettiin lämpökaappiin kasvamaan.

Soluviljelyn työvaiheet tehtiin steriileissä olosuhteissa laminaarivirtauskaapissa. Ennen jokaisen työvaiheen aloitusta laminaarivirtauskaappi desinfioitiin 5 % bentsalkoniumkloridilla ja 70 % etanolilla. Kaikki kaappiin laitettavat välineet ja materiaalit käsiteltiin kauttaaltaan suihkuttamalla ne 70 % etanolilla. Kaikissa työvaiheissa käytettiin työtakkia ja suojakäsineitä. Solujen vaurioitumista estettiin käyttämällä vähintään huoneenlämpöisiä liuoksia, mielellään + 37 °C. Liuokset lämmitettiin tarvittaessa +37 °C vesihauteessa.

5.2 Solujen altistaminen

Vuorokautta ennen altistusta solut siirrettiin viljelyastioihin. Ne siirrostettiin kuten yllä mainitussa soluviljelyvaiheessa, mikrotumamenetelmää varten T25-viljelypulloihin, ja komeettamenetelmää varten kuoppalevyille. Viljelyastiat näkyvät kuviossa 5. Altistus aloitettiin kun soluja oli viljelty 24 tuntia siirrostuksen jälkeen.



Kuvio 5. Vasemmalla olevassa kuvassa edessä on kaksi T25-soluviljelypulloa ja takana isompi T75-soluviljelypullo. Oikealla olevassa kuvassa on 24-paikkainen kuoppalevy.

Tässä työssä tutkitut nanopartikkelit olivat päällystämättömiä rautaoksidin nanopartikkeleita, maghemiittia (γ - Fe_2O_3). Näiden magneettisten, kristallimaisten partikkelien keskimääräinen koko oli 8 nm. Käytetyt pitoisuudet olivat 10, 25, 50, 100, 150, 200, 500 ja 1000 $\mu\text{g/ml}$. Lisäksi mukana olivat negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Negatiivinen kontrolli oli vertailukohtana muille pitoisuuksille ja positiivinen kontrolli kertoi käytettyjen menetelmien toimimisesta.

Altistuksissa käytetyt pitoisuudet valittiin Työterveyslaitoksella syksyllä 2013 tehtyjen sytotoksisuustutkimusten perusteella (liite 1). Sytotoksisuustutkimuksissa soluja altistettiin nanokokoisella rautaoksidilla kolmen, 24 ja 48 tunnin ajan eri pitoisuuksilla. Sytotoksisuustutkimukset tehtiin Trypan Blue menetelmällä. Trypan Blue on molekyyli, joka pääsee vain hajonneen solukalvon läpi. Se sitoutuu solunsisäisiin proteiineihin ja näin värjää solun siniseksi. Sillä voidaan siis erottaa ja laskea suoraan elävät ja kuolleet solut toisistaan, sillä vain kuolleet solut näyttävät sinisiltä, elävien jäädessä värjäytymättömiksi. (Nexcelom Bioscience).

Sytotoksisuustutkimusten tuloksista voitiin päätellä, että pidempi altistusaika laski elossa olevien solujen määrää myös pienemmillä pitoisuuksilla. Päälystämätön nanokokoinen rautaoksidi ei kuitenkaan näyttänyt olevan kovin sytotoksista, sillä se saavutti suurimman sytotoksisuutensa 48 tunnin jälkeen altistuksesta pitoisuudessa 800 µg/ml, jolloin elossa olevia soluja verrattuna negatiiviseen kontrolliin oli 63 %.

Tavallisesti vahvin altistuksessa käytettävä pitoisuus on aina ensimmäinen sytotoksisuustutkimusten pitoisuuksista, joka on enemmän kuin 40 % sytotoksinen. Kuitenkin tämän työn kohdalla vahvimmassa pitoisuudessa 68 % ja toiseksi vahvimmassa 63 % soluista oli yhä elossa 48 tunnin jälkeen altistamisesta. Koska 40 % sytotoksisuuden saavuttamiseksi annosten pitoisuudet olisivat nousseet liian korkeiksi, tässä työssä tehtyjen genotoksisuustutkimusten korkeimmaksi pitoisuudeksi valittiin tavallisesta poiketen sytotoksisuustutkimusten korkein pitoisuus.

Laimennosten tekeminen aloitettiin tekemällä kantaliuos. Siihen punnittiin 10 mg/ml päälystämätöntä nanokokoista rautaoksidia ja 6 ml steriiliä vettä, jossa 0,2 % BSA:ta (Bovine Serum Albumine). Valmis kantaliuos laitettiin sonikaattoriin. Nanomateriaalien partikkelit saattavat kasautua säilytyksessä, joten on tärkeää erottaa kasautuneet partikkelit toisistaan, jotta tutkittava materiaali vastaisi oikeasti nanomateriaalin määrittelmää. Sonikaattori erottaa ultraäänen avulla nanokokoisia partikkeleita toisistaan.

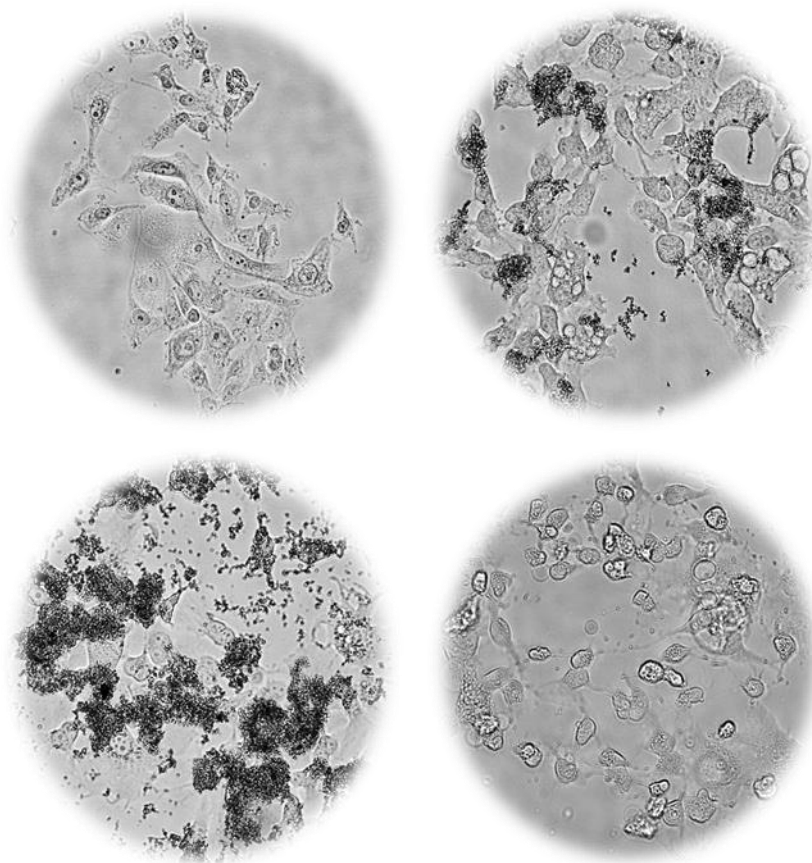
Ensimmäisen sonikoinnin jälkeen kantaliuoksesta laimennettiin käyttöliuos pipetoimalla 1,2 ml kantaliuosta ja 4,8 ml BEGM:a, jolloin pitoisuudeksi saatiin 2 mg/ml. Koska myös käyttöliuokset sonikoitiin, pipetoitiin yhteensä neljä erillistä putkea, jotta sonikointitiheys saatiin pysymään 6 millilitrassa laitteen vaatimista syistä. Käyttöliuosputkien sonikoinnin jälkeen liuos laimennettiin BEGM:lla aiemmin mainittuihin altistuksessa käytettäviin pitoisuuksiin. Laimennosten pipetointia koskevat taulukot löytyvät liitteestä 2.

Sonikoinnin onnistuminen eli se, kuinka pieninä partikkeleina rauta on, tarkistettiin DLS-menetelmällä. DLS-laite (Dynamic Light Scatterin) pystyy mittaamaan halkaisijaltaan jopa yhden nanometrin kokoisia partikkeleita. DLS-laitteessa näytteeseen kohdistetaan lasersäde, ja näytteestä siroavan valon heilahtelut mitataan nopealla fotonidetektorilla tunnetussa kulmassa θ . Partikkelit saavat valon siroamaan, ja näin antavat tietoa liikkeestään. Siroavan valon heilahtelut taas antavat tietoa partikkeleista. (LS Instruments.). Tämän työn kohdalla DLS-tulokset osoittivat, että materiaali oli melko

suurina kappaleina liuoksessa sonikoinnista ja näytteiden sekoittamisesta huolimatta. Tulokset kuvaajineen on esitetty liitteessä 3.

Solujen altistuksessa soluilta poistettiin vanha kasvatusliuos ja tilalle lisättiin altistus-suspensiota, jokaiseen pulloon tai kuoppaan omaa pitoisuuttaan. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin aina myös rinnakkainen näyte. Altistetut solut laitettiin lämpökaappiin menetelmien vaatimiksi ajoiksi, joista kerrotaan seuraavissa alaluvuissa. Keräysvaiheen aikataulutus ja pipetointikaavio on liitteessä 4.

Solujen viljelyssä ja altistuksessa niitä tarkasteltiin mikroskoopilla useasti, jotta tiedettiin miten ne voivat. Kuviossa 6 on esitelty altistamattomia soluja sekä nanokokoisella rautaoksidilla ja mitomysiini C:llä altistettuja soluja 48 tuntia altistuksen jälkeen. Ylhäällä vasemmalla ovat altistamattomat solut, joista suurin osa on elossa. Elävät solut ovat vaaleita ja muodoltaan hieman pitkulaisia, kun taas kuollessaan solut muuttuvat kirkkaammiksi ja pyöreämmiksi. Ylhäällä oikealla solut on altistettu 25 µg/ml ja alhaalla vasemmalla pitoisuudella 200 µg/ml päällystämättömällä nanokokoisella rautaoksidilla. Kuvissa näkyy sekä eläviä, että kuolleita soluja. Myös rauta on nähtävissä tummana värinä, vahvemmassa pitoisuudessa väriä on selkeästi enemmän. Alhaalla oikealla solut on altistettu mitomysiini C:lla, joka toimii positiivisena kontrollina, kuvasta näkyy suurimman osan soluista olevan kuolleita, pyöreänomaisia.



Kuvio 6. Solut 48 tuntia nanokokoisella rautaoksidilla altistamisesta. Ylhäällä vasemmalla solut ovat altistamattomia. Ylhäällä oikealla solut on altistettu 25 $\mu\text{g/ml}$ ja alhaalla vasemmalla pitoisuudella 200 $\mu\text{g/ml}$ rautaoksidilla. Alhaalla oikealla solut on altistettu mitomysiini C:llä. Kaikki kuvat ovat 20-kertaisia suurennoksia.

5.3 Komeettamenetelmän toteutus

Tässä työssä käytetty komeettamenetelmän sovellutus on $\text{pH} > 13$ alkalinen yksittäisen solun geielektroforeesimenetelmä DNA-vaurion kartoittamiseksi soluissa (the $\text{pH} > 13$ alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in cells). Liitteessä 5 on kuvattu työssä käytetty komeettamenetelmän työohje.

Komeettamenetelmän valmistelut aloitettiin esivalmistelemalla objektilasit. Lasien päällystämiseen käytettiin 1,5 % normaalin sulamispisteen agarosigeeliä. Lasi kastettiin kuumaan geeliin hiospään puoleen väliin saakka, nostettiin varovasti ylös ja sen takiosa kuivattiin ylimääräisestä geelistä. Lasit asetettiin huoneenlämpöön tasaiselle alustalle kuivumaan noin viikoksi. Laseja säilytetään kuivissa olosuhteissa huoneenlämmössä.

Komeettamenetelmässä käytettävät natriumhydroksidi ja EDTA, säilyvät noin kaksi viikkoa, joten sujuvamman työn takaamiseksi ne tehtiin valmiiksi etukäteen. Lisäksi valmistettiin neutralisointipuskuri ja hajotusliuos. Tuoreet käyttöliuokset tehtiin vasta juuri ennen kutakin työvaihetta, jossa kyseistä liuosta tarvittiin. Ennen solujen keräystä hajotusliuokseen lisättiin 1 % Triton X-100:aa ja ennen elektroforeesin aloitusta natriumhydroksidista, EDTA:sta ja tislatus vedestä tehtiin tuore elektroforeesipuskuri, jonka pH:n varmistettiin olevan yli 13 yksijuosteisen DNA:n takaamiseksi. Tarkemmat tiedot käytetystä liuoksista löytyy liitteestä 5.

Soluja viljeltiin 120 000 solua/kuoppa 24-paikkaisella kuoppalevyllä lämpökaapissa. Noin vuorokauden kuluttua solut altistettiin rautaoksidilla pitoisuuksilla 10, 25, 50, 100, 150, 200, 500 ja 1000 µg/ml. Altistamisesta ja pitoisuuksien valinnasta on kerrottu tarkemmin kappaleessa 5.2.

Tutkittavien pitoisuuksien lisäksi mukana oli aina sekä positiivinen että negatiivinen kontrolli. Negatiivisena kontrollina käytettiin BEGM:a, jota pipetoitiin ensimmäiseen näytekuoppaan altistuksen yhteydessä, kuten altistussuspensioita. Positiivisena kontrollina käytettiin vetyperoksidia, joka varmuudella aiheuttaa vauriota DNA:han. 10 % vetyperoksidia pipetoitiin 3,8 µl viimeiseen, ainoastaan BEGM:a sisältävään kuoppaan 10 minuuttia ennen keräyksen aloitusta. Tällöin vetyperoksidipitoisuudeksi saatiin 0,076 %. Negatiivisen kontrollin tarkoituksena on olla vertailukohtana muille pitoisuuksille. Positiivisella kontrollinäytteellä varmistetaan geelielektroforeesin oikea toiminta.

Kaikista näytteistä sekä molemmista kontrolleista pipetoitiin myös rinnakkaiset näytteet, jotta tuloksista tulisi luotettavampia. Yhdellä pitoisuudella tai kontrollilla altistettiin solut kahdessa kuoppalevyn kuopassa, joten lopullisia analysoitavia näytteitä tuli yhteensä 20. Jokaisesta näytteestä tehtiin myös rinnakkaiset analysoitavat objektilasit, joten objektilaseja tuli yhteensä 40.

Näytteet kerättiin omiin putkiinsa kolmen ja 24 tunnin jälkeen altistuksesta. Keräys tapahtui muuten samalla tavalla kuin kappaleessa 5.1 kuvatussa solujen siirrostuksessa, mutta keräysvaiheessa trypsiinin vaikutusaika on pidempi. Tällä varmistetaan kaikkien solujen irtoaminen kasvatusalustastaan, sillä tutkittavan materiaalin ollessa läsnä, solut takertuvat alustansa tiukemmin. Lisäksi komeettamenetelmässä on tärkeää, että lisätävän seerumillisen kasvatusliuoksen lämpötila on + 4 °C ja tämän jälkeen soluja pide-

tään kylmäalustalla tai jäissä. Tällä pyritään huoneenlämmössä aiheutuvien ylimääräisten soluvaurioiden minimoimiseen.

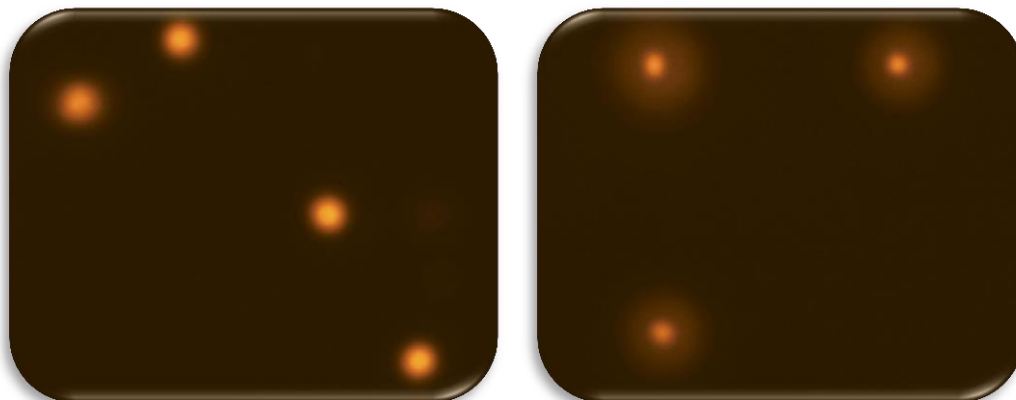
Kerätyt solut sekoitettiin matalan sulamispisteen agarosigeelin kanssa yksi näyte kerrallaan ja pipetoitiin heti esivalmistellulle, agarosilla päällystetylle objektilasille. Solususpension ja agarosigeelin suhde laskettiin niin, että yhdelle lasille tulisi 50 000 solua. Objektilasille pipetoitiin 60 µl agarosiin sekoitettua solususpensiota ja päälle lisättiin heti peitinlasi, joka tasoittaa näytteen objektilasille. Kuten aiemmin on mainittu, yhtä näytettä pipetoitiin kahdelle rinnakkaiselle objektilasille. Objektilaseja näytteineen jäähdytettiin kylmäalustan päällä noin 15 minuutin ajan, jonka jälkeen peitinlasi irrotettiin varovasti. Objektilasit siirrettiin kylmään hajotusliuokseen jääkaappiin, jossa liuoksen annettiin vaikuttaa hajottaen soluja yön yli, elektroforeesiajon aloitukseen asti.

Seuraavana päivänä kustakin solujen keräyksestä, noin vuorokauden kuluttua näytteiden siirtämisestä objektilaseille, objektilasit laitettiin alkaliliuokseen 20 minuutiksi, jotta DNA:sta saadaan yksijuosteista. Soluista mahdollisesti irtoava DNA eroteltiin elektroforeesilla. Jännitteenä käytettiin 0,74 V/cm ja sähkövirraksi asetettiin 300 mA. Elektroforeesipuskurina käytettiin samaa alkaliliuosta. Elektroforeesiajon jälkeen alkaliliuos neutralisoi tiputtamalla lasille kolmesti muutamia pisaroita neutralisointipuskuria viiden minuutin ajaksi. Lopuksi lasit huuhdeltiin kastamalla ne tislatussa vedessä ja jätettiin pimeään kuivumaan. Kuivattuna lasit säilyvät kauan ja analysoinnin voi tehdä sille sopivana ajankohtana.

Ennen analysoimisen aloittamista näytteet koodattiin, eli ne tehtiin tunnistamattomiksi. Kaikille objektilaseille riippumatta altistusajan pituudesta, rinnakkaisnäytteestä tai altistettavan materiaalin pitoisuudesta, annettiin sattumanvaraisesti numerot 1-40. Näytteiden koodaamisella varmistetaan objektiivisuus näytteitä analysoitaessa ja näin ollen luotettavimmat tulokset.

Näytteitä analysoitaessa objektilaseille lisättiin etidiumbromidia, joka värjää näytteessä olevan DNA:n. Näytteet analysoitiin fluoresenssimikroskoopilla, johon on yhdistetty kamera, käyttäen tarkoitusta varten kehitettyä puoliautomatisoitua tietokoneohjelmaa, Komet 5.5:tä. Jokaiselta objektilasilta kuvattiin 50 solua, jotka ohjelma analysoi. Solut ovat joko pyöreitä, jolloin niiden DNA-vaurio on hyvin vähäistä tai sitä ei ole, tai niissä voi olla häntä vaurion merkiksi (kuvio 7). Kaikki vastaan tulevat solut kuvattiin, ellei niissä ollut artefaktaa tai ne olleet esimerkiksi ilmakuplan sisällä. Saadut tulokset tal-

lennettiin tulosten analysointia varten. Näytteiden analysoinnin jälkeen peitinlasit poistettiin ja lasit asetettiin kuivumaan. Lasit säilyvät käytännössä rajattomasti huoneenlämmössä, kunhan on huolehdittu että ne ovat valolta suojattuina.



Kuvio 7. Vasemmalla kuva normaaleista soluista ja oikealla kuvia vaurioituneista soluista, joiden DNA on solun ympärillä/hännässä. Solukuvat on otettu 20-kertaisella suurennoksella.

Komeettamenetelmää käytettäessä on otettava huomioon, että miltei kaikki työvaiheet on tehtävä keltaisen valon alla. Tavallisen loisteputkivalon tai luonnonvalon UV-säteily voi aiheuttaa ylimääräisiä vaurioita DNA:han. Analysointivaiheessa loisteputkivalo tai luonnonvalo myös haalistaa värjäystä. DNA-vaurioita voidaan ehkäistä myös pitämällä näytteitä kylmässä, kohdissa jotka edellä on mainittu. Huomioitavaa on myös, että etidumbromidi on erittäin myrkyllinen, karsinogeeninen aine, joten sen kanssa työskenneltäessä tulee ehdottomasti käyttää suojakäsineitä ja työskennellä erityisen huolellisesti.

5.4 Mikrotumamenetelmän toteutus

Mikrotumamenetelmää varten solut siirrostettiin kasvamaan T25-soluviljelypulloihin 1 000 000 solua/pullo, niin että jokaisesta kahdeksasta pitoisuudesta tehtiin rinnakkaiset näytteet ja lisäksi tehtiin negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Soluviljelypulloja, eli näytteitä, tuli yhteensä 20. Siirrostettuja soluja viljeltiin lämpökaapissa seuraavaan päivään asti. Seuraavana päivänä solut altistettiin nanokokoisella rautaoksidilla. Negatiivisessa kontrollissa soluille vaihdettiin uusi BEGM, positiivisena kontrollina käytettiin mitomysiini C:tä (0,15 µg/ml). Tämän jälkeen soluviljelypullot siirrettiin lämpökaappiin ja

kuuden tunnin kuluttua altistuksesta jokaiseen pulloon lisättiin sytokalasiini B:tä (9 µg/ml).

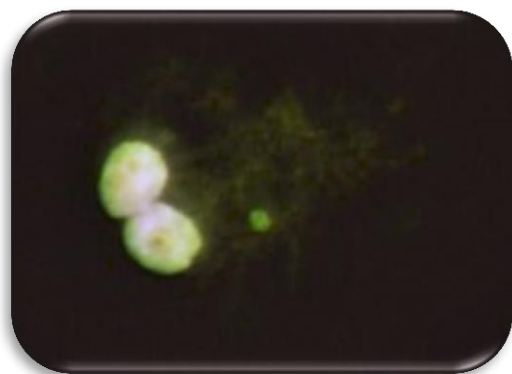
Soluja viljeltiin, kunnes altistuksesta oli kulunut 48 tuntia. Tämän jälkeen solut kerättiin noudattaen työohjetta, joka on esitetty liitteessä 6. Soluilta poistettiin BEGM ja solut pestiin kahteen kertaan PBS:lla, jotta mahdollisimman paljon materiaalia saataisiin pestyä pois. Solut irrotettiin viljelypulloista trypsiinikäsittelyllä ja jokainen näyte kerättiin omaan putkeensa. Putket sentrifugoitiin, jonka jälkeen solut pestiin vielä kerran PBS:lla.

Tämän jälkeen soluille tehtiin hypotoninen käsittely ja fiksaatio. Hypotoninen liuos lisättiin putkiin nopeasti pipetoiden ja liuoksen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä kaksi minuuttia. Käsittelyvaihe täytyy suorittaa nopeasti, jotta solut eivät turpoaisi liikaa ja hajoaisi. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin ja supernatantti poistettiin. Fiksaatiossa eli kiinnityksessä putkiin lisättiin kahdessa ensimmäisessä fiksaatiokäsittelyssä fiksaatioliuos 1:ta (metanoli:etikkahappo, 3:1), ja tämän jälkeen fiksointiin käytettiin fiksaatioliuos 2:ta (metanoli 97 % + etikkahappo 3 %). Jokaisen fiksoinnin jälkeen putket sentrifugoitiin, supernatantti poistettiin ja solupelletti hajotettiin esimerkiksi naputtamalla putken kylkeen. Lopuksi putkiin lisättiin fiksaatioliuos 2, ja putket laitettiin pakastimeen. Hypotonisen käsittelyn ja fiksoinnin merkityksestä on kerrottu kappaleessa 3.3.

Kun näytteiden analysoiminen oli ajankohtaista, putket otettiin pois pakastimesta ja sentrifugoitiin. Supernatantti poistettiin ja tilalle lisättiin noin 10 tippaa tuoretta fiksaatioliuos 2:ta. Solut sekoitettiin hyvin fiksaatioliuokseen ja suspensiota tiputettiin objektilasille noin 4 tippaa. Objektiasia kallistettiin tiputtamisen aikana niin, että pisarat valuivat tasaisesti koko objektilasille. Mikroskoopin avulla varmistettiin, että solut eivät olleet lasilla liian harvasti tai liian tiheästi. Jokaisesta näytteestä tehtiin 4 objektiasia, joiden annettiin kuivua huoneenlämmössä.

Kuivuneet objektilasit värjättiin akridiinioranssi/DAPI-värjäyksellä. Huomioitavaa oli, että värjäys ja sen jälkeiset työvaiheet tapahtuivat valolta suojattuna, sillä valo haalistaa värjäystä. Objektilaseja värjättiin akridiinioranssiliuoksessa yhden minuutin ajan, jonka jälkeen ne pestiin Sörensenin puskurissa 3 x 3 minuuttia. Tämän jälkeen objektilaseille tiputettiin kolme pisaraa DAPI:a (1 µg/ml), ne peitettiin peitinlasilla ja DAPI:n annettiin vaikuttaa viisi minuuttia. Peitinlasit poistettiin, objektilasit huuhdeltiin juoksevan hanaveden alla ja jätettiin kuivumaan pystyasentoon valolta suojattuna.

Ennen analysointia näytteet koodattiin niin, että analysointivaiheessa ei tiedetty mitä pitoisuutta kullakin objektilasilla on. Juuri ennen analysointia objektilaseille tiputettiin muutama pisara Sörensenin puskuria ja päälle laitettiin peitinlasi. Näytteet analysoitiin pimeässä tilassa fluoresenssimikroskoopilla käyttämällä D/F/T-suodatinta, jolloin akridiinioranssin värjäämät tumat näkyivät vihreinä ja sytoplasmat oransseina, kuten kuvio 8 nähdään.



Kuvio 8. Kuva kaksitumaisesta solusta jossa on mikrotuma. Akridiinioranssin värjäämät tumat ja mikrotuma näkyvät vihreinä.

Jokaisesta näytteestä laskettiin ensin proliferaatio- eli jakautumisindeksi (Cytokinesis Block Proliferation Index, CBPI). CBPI kertoo jakautuvatko solut normaalisti. Jokaisesta näytteestä laskettiin ensin 100 solua. Näistä sadasta solusta laskettiin kuinka monta 1-, 2-, 3- ja yli 3-tumaista kustakin näytteestä löytyy. Indeksiksi laskettiin luvussa 3.3 esitellyllä kaavalla.

Tämän jälkeen laskettiin ainoastaan kaksitumaisia soluja. Laskuun otettiin huomioon vain sellaiset kaksitumaiset, jotka täyttivät kappaleessa 3.3 kerrotut kriteerit. Näitä kaksitumaisia soluja laskettiin kustakin näytteestä 2000. Erilliselle lomakkeelle kirjattiin kuinka monta kaksitumaista solua, joissa on yksi, kaksi, kolme tai useampi mikrotuma, löytyi näitä 2000 solua kohden. Lisäksi laskettiin myös tumasiltojen (nucleoplasmic bridge, NPB) määrä ja tumasilloilla kiinni olevat mikrotumat (nuclear bud, NBUD). Tämän työn kannalta tumasiltojen ja tumasilloilla kiinni olevien mikrotumien määrä ei ollut oleellista, mutta ne laskettiin, sillä tietoa voidaan hyödyntää Työterveyslaitoksella kokonaisprojektissa. Löytyneet mikrotumat varmistettiin käyttämällä DAPI-suodatinta, jolloin DNA-spesifisen DAPIn värjäämä DNA näkyi sinisenä. Tällä varmistettiin, että mikrotumat sisälsivät DNA:ta.

6 Työn tulokset

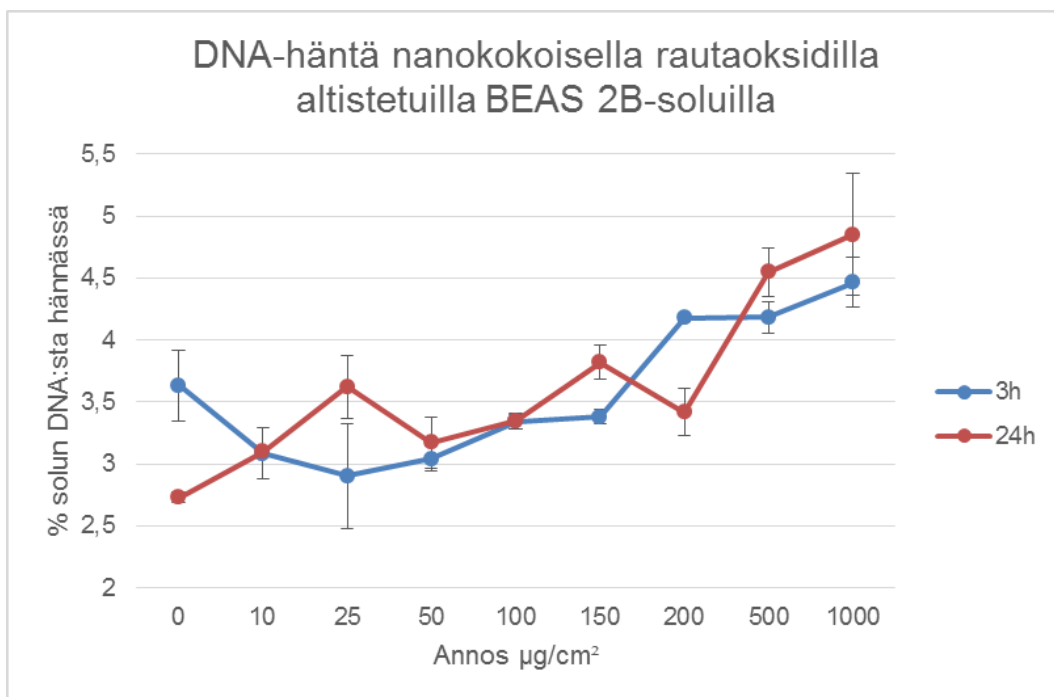
Työn tulokset kerättiin molempien menetelmien kohdalla Microsoft Office Excel – taulukkolaskentaohjelmaan, jonka avulla laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvot ja prosenttiosuudet ja jolla saaduista tuloksista piirrettiin kuvaajat. Kuvaajat on esitelty menetelmäkohtaisesti tämän luvun alaluvuissa yhdessä tilastollisten analyysien kanssa.

Tilastolliset analyysit teki Työterveyslaitoksen tutkija Julia Catalán, joka valitsi tilastollisissa analyyseissa käytettävät testit Työterveyslaitoksella yleisesti kyseessä olevien menetelmien analyyseissä käytettävien testien perusteella. Tulokset analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA, One Way Analysis of Variance), molempien menetelmien sekä kaikkien altistusaikojen kohdalla. Tukeyn monivertailutestiä käytettiin post-hoc testinä, jotta altistuksessa käytettyjä pitoisuuksia voitiin vertailla keskenään. Kontrollien tilastolliseen analyysiin käytettiin yksisuuntaista paritonta t-testiä.

6.1 Komeettamenetelmä

DNA-vaurioiden keskiarvot kerättiin Database viewer -ohjelmalla, joka kerää jokaisesta Komet 5.5 -ohjelman avulla kuvatusta näytteestä % Tail DNA -arvot eli kuinka monta prosenttia solun DNA:sta on muodostuneessa hännässä ja laskee niille keskiarvot. Saadut tulokset analysoitiin ja saatujen arvojen perusteella piirrettiin kuvaajat. Kuvaajien perustana olleet numeeriset tulokset ovat liitteessä 7.

Kuviossa 9 kuvataan solun DNA-häntää suhteessa nanokokoisen rautaoksidin annokseen altistussuspensiossa. X-akselilla on nanokokoisen rautaoksidin pitoisuudet $\mu\text{g/ml}$ ja y-akselilla solun DNA:n prosentuaalinen osuus solun hännässä. Kolme tuntia altistuksesta altistamattomassa näytteessä eli negatiivisessa kontrollissa (pitoisuus $0 \mu\text{g/ml}$) solun DNA:sta oli hännässä 3,63 % ja pitoisuudessa $1000 \mu\text{g/ml}$ 4,46 %. Alimillaan prosentti oli kolmen tunnin altistuksessa pitoisuudessa $25 \mu\text{g/ml}$ (2,90 %). 24 tunnin aikapisteessä alin arvo oli negatiivisella kontrollilla (2,73 %) ja ylin arvo pitoisuudella $1000 \mu\text{g/ml}$ (4,85 %). Muiden pitoisuuksien tulokset sijoittuvat näiden tulosten välille 24 tunnin aikapisteessä. Kuviossa on myös nähtävissä keskiarvovirheet.



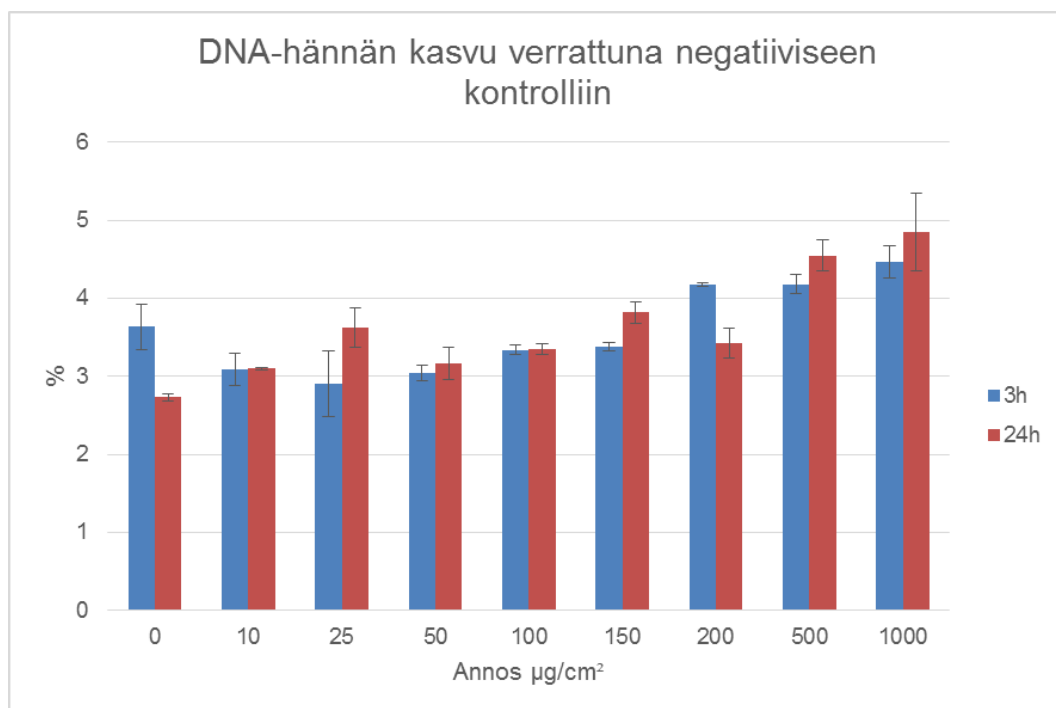
Kuvio 9. Solujen DNA:n prosentuaalinen osuus hännässä rautaoksidilla altistetuilla BEAS 2B -soluilla.

Kolmen tunnin altistuksessa annoksen vaikutus oli merkitsevä ($p < 0,01$). Mikään tutkituista pitoisuuksista ei kuitenkaan merkitsevästi eronnut nollanäytteestä. Sen sijaan, pitoisuudet 10, 25 ja 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poikkeavat merkitsevästi ($p < 0,05$) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisuudesta. Lisäksi pitoisuus 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poikkeaa merkitsevästi pitoisuuksista 200 ja 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

24 tunnin altistuksessa annoksen vaikutus oli merkitsevä ($p < 0,01$). Vain 500 ja 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poikkesivat merkitsevästi ($p < 0,01$) negatiivisesta kontrollista. Lisäksi pitoisuudet 10 ja 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poikkesivat merkitsevästi pitoisuudesta 500 ($p < 0,05$) ja 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,01$), kun taas pitoisuudet 100 ja 200 poikkesivat merkitsevästi ($p < 0,05$) pitoisuudesta 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

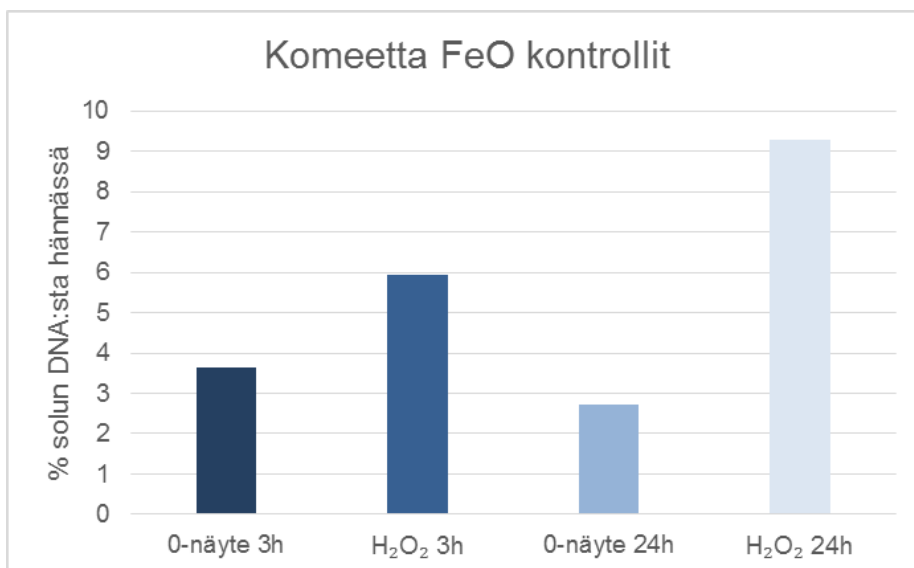
DNA-hännän kasvu verrattuna altistamattomaan näytteeseen on kuvattu kuviossa 10. X-akselilla on nanokokoisen rautaoksidin pitoisuudet altistuksessa $\mu\text{g}/\text{ml}$ ja y-akselilla solun hännän DNA:n keskiarvo prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista. Negatiivisen kontrollin arvo on 100 %. Kolmen tunnin altistuksessa prosenttiosuus notkahtaa hieman negatiivisen kontrollin jälkeen ja on alimmillaan pitoisuudessa 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (79,85 %) ja korkeimmillaan pitoisuudessa 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (122,86 %). 24 tunnin altistuksessa prosenttiosuus kasvaa koko ajan ja on alimmillaan pitoisuudessa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (113,45 %)

ja suurimmillaan pitoisuudessa 1000 µg/ml (177,58 %). Kuvioon on merkitty myös keskiarovirheet.



Kuvio 10. DNA-hännän prosentuaalinen kasvu verrattuna altistamattomaan näytteeseen.

Menetelmän toiminta varmistettiin positiivisella kontrollilla. Komeettamenetelmän positiivinen kontrolli, vetyperoksidi (H_2O_2), verrattuna negatiiviseen kontrolliin (0-näyte), nähdään kuviossa 11. X-akselilla on kuvattu sekä kolmen että 24 tunnin aikapisteiden negatiiviset sekä positiiviset kontrollit. Y-akselilla puolestaan on solun DNA:n prosentuaalinen osuus solun hännässä. Kolmen tunnin aikapisteessä negatiivisessa kontrollissa DNA:ta hännässä oli 3,63 % ja positiivisessa kontrollissa 5,93 %. 24 tunnin kohdalla vastaavat arvot olivat negatiiviselle 2,79 % ja positiiviselle kontrollille 9,28 %.



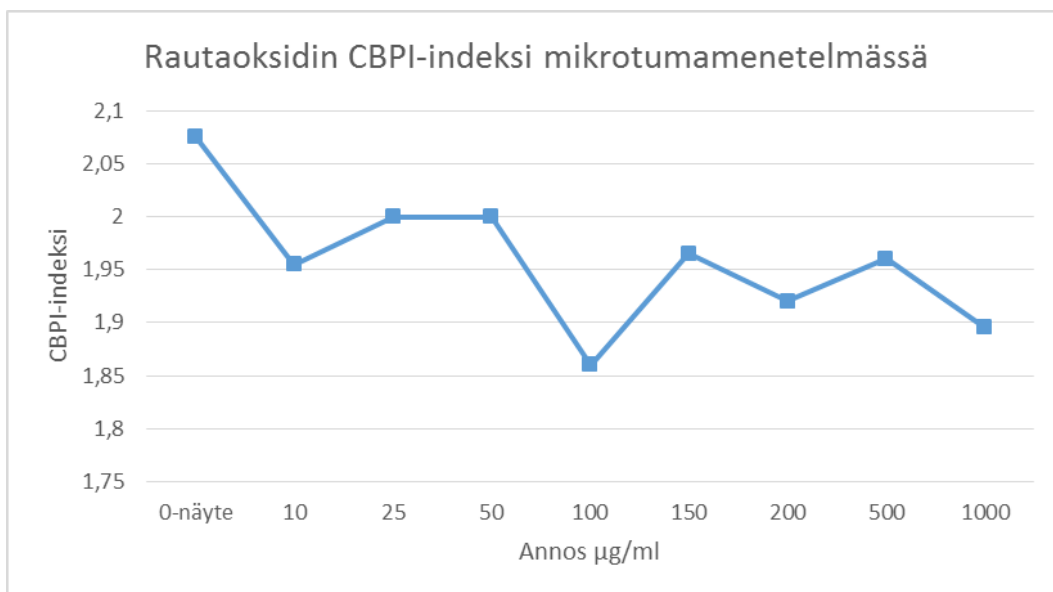
Kuvio 11. Komeettamenetelmän positiivinen kontrolli, H₂O₂ verrattuna negatiiviseen kontrolliin eli altistamattomaan solususpensioon (0-näyte).

Negatiivista ja positiivista kontrollia (H₂O₂) vertailtiin yksisuuntaisella parittomalla t-testillä. Sekä kolmen että 24 tunnin altistuksissa H₂O₂:n aiheuttamat vauriot olivat tilastollisesti merkitseviä ($p < 0,05$ ja $p < 0,01$, tässä järjestyksessä). Täten voidaan todeta, että menetelmä toimi molemmilla altistusajoilla.

6.2 Mikrotumamenetelmä

Mikrotumamenetelmän tuloksia analysoitaessa jokaiselle pitoisuudelle laskettiin ensin CBPI- indeksi. CBPI-indeksin laskukaava esiteltiin luvussa 3.3. Tässä työssä laskettujen solujen määrä oli 100. Tämän jälkeen rinnakkaisten näytteiden CBPI-indekseille laskettiin keskiarvot ja saadut tulokset syötettiin oheiseen kuvion 12 kuvaajaan. Kuviossa x-akselilla on käytetyt pitoisuudet µg/ml ja y-akselilla CBPI- eli proliferaatioindeksi. CPBI-indeksin arvo vaihtelee välillä 1-2, jossa yksi tarkoittaa, että solut eivät ole jakaantuneet ollenkaan. Kuvioista 12 nähdään, että CBPI-indeksi käytetyillä BEAS 2B-soluilla vaihteli välillä 1,86–2,075. Korkeimmillaan proliferaatioindeksi oli negatiivisessa kontrollissa (pitoisuus 0 µg/ml) ja matalimmillaan pitoisuudessa 100 µg/ml.

Mitään merkitseviä eroja CBPI-indeksien kohdalla pitoisuuksien välillä ei havaittu. Käytetyt annokset eivät siis olleet liian toksisia tai sytostaattisia soluille, joten voidaan todeta tutkimuksen olevan asianmukaisesti tehty.



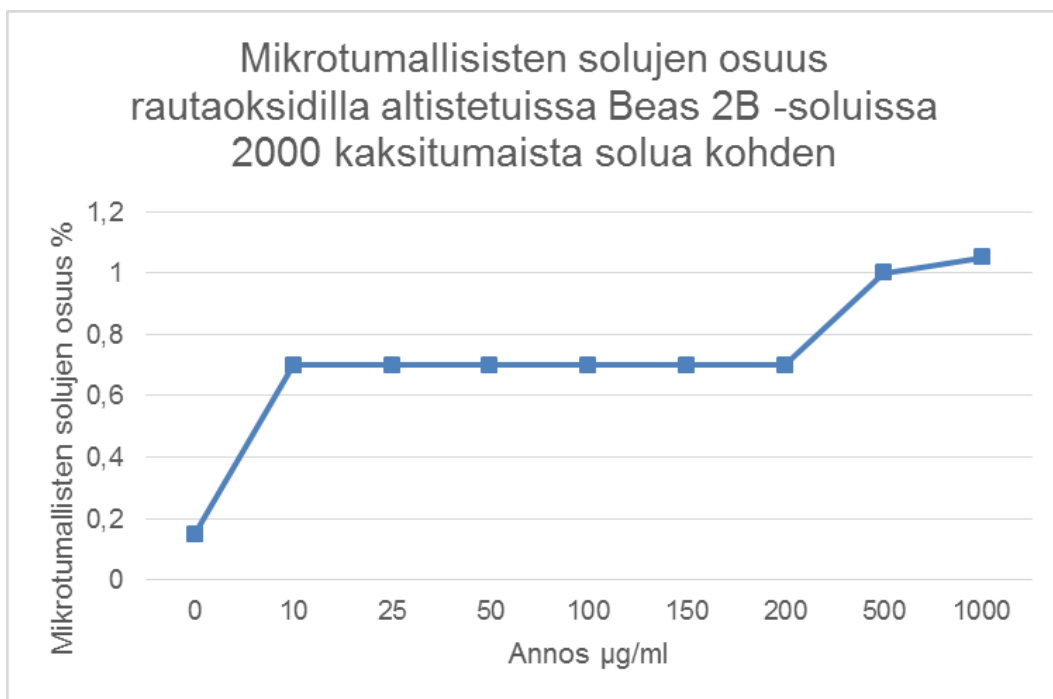
Kuvio 12. Rautaoksidin proliferaatio- eli CBPI-indeksi mikrotumamenetelmässä.

Tämän jälkeen laskettiin kuinka monta prosenttia 1000 lasketusta kaksitumaisesta solusta on mikrotumallisia. Rinnakkaisille näytteille laskettiin keskiarvot. Tulokset on esitetty kuviossa 13, jossa x-akselilla on käytetyt pitoisuudet $\mu\text{g/ml}$ ja y-akselilla on prosenttiyksikkönä mikrotumallisten solujen osuus 2000 lasketusta kaksitumaisesta. Mikrotumallisten solujen prosenttiosuus vaihteli välillä 0,15–1,05. Vähiten mikrotumallisia soluja oli negatiivisessa kontrollissa (0,15 %) ja korkeimmillaan mikrotumallisia soluja oli pitoisuudessa 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1,05 %). Mikrotumamenetelmän numeeriset tulokset ovat liitteessä 8.

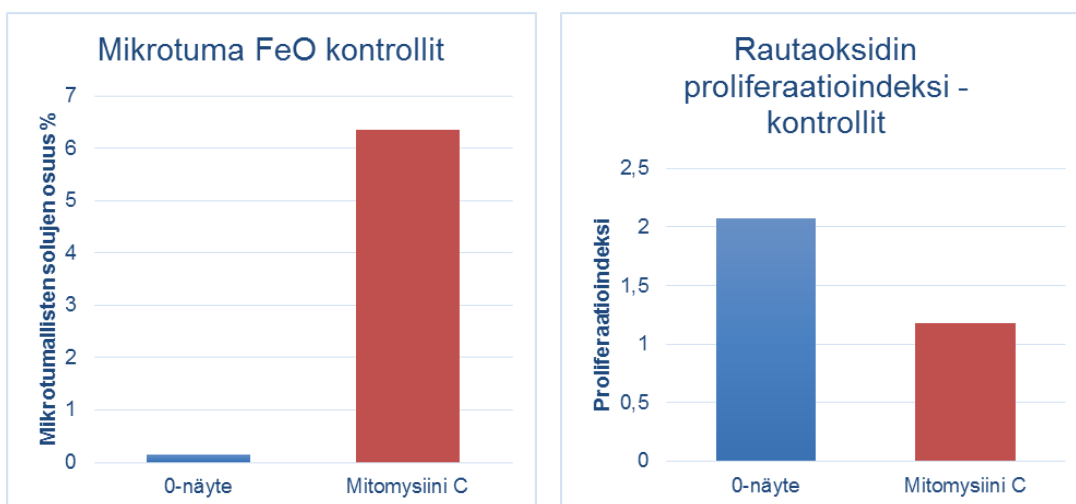
Annoksen vaikutus oli merkitsevä ($p < 0,05$). Vain 500 ja 1000 $\mu\text{g/ml}$ pitoisuudet erosivat merkitsevästi ($p < 0,05$) negatiivisesta kontrollista.

Menetelmän toimimisen varmistamiseksi käytettiin positiivista kontrollia. Kuviossa 14 vasemmalla on esitetty positiivinen kontrolli, mitomysiini C, rinnakkain negatiivisen kontrollin (0-näyte) kanssa. Y-akselilla on mikrotumallisten solujen prosenttiosuus 2000 lasketusta kaksitumaisesta solusta. Negatiivisessa kontrollissa eli alistamattomissa soluissa mikrotumallisia soluja oli 0,15 %, ja positiivisessa mitomysiini C -kontrollissa mikrotumallisia soluja oli 6,35 % lasketuista 2000 kaksitumaisesta solusta.

Kuviossa 14 oikealla on esitetty positiivisen kontrollin mitomysiini C:n ja negatiivisen kontrollin (0-näyte) proliferaatio- eli CBPI-indeksit rinnakkain. Y-akselilla on CBPI-indeksi. Negatiivisessa kontrollissa indeksi oli 2,075 ja positiivisessa kontrollissa 1,175.



Kuvio 13. Mikrotumia sisältävien kaksitumaisten solujen osuus prosentteina rautaoksidilla altistetuissa Beas 2B -soluissa kahtatuhatta kaksitumaista kohden.



Kuvio 14. Vasemmalla on mikrotumamenetelmän positiivisen kontrollin, mitomysiini C:n ja negatiivisena kontrollina käytetyn altistamattoman näytteen (0-näyte) mikrotumallisten solujen prosenttiosuudet. Oikealla on positiivisen ja negatiivisen kontrollin proliferaatioeli CBPI-indeksit.

Positiivisen kontrollin (mitomysiini C) ja negatiivisen kontrollin vertailu tehtiin yksisuuntaisella parittomalla t-testillä. Sekä mitomysiini C:n aiheuttamat mikrotumat prosenttei-

na että CBPI-indeksi erosivat merkitsevästi ($p < 0.05$) vastaavista negatiivisista kontroleista, joten menetelmän voidaan sanoa toimineen oikein.

7 Tulosten tarkastelu ja pohdinta

Työn tarkoituksena oli arvioida nanokokaisen rautaoksidin genotoksisia eli perimää vaurioittavia vaikutuksia ihmisen keuhkoepiteelisoluilla käyttäen komeetta- ja mikrotumamenetelmiä. Tämän luvun tarkoituksena on tarkastella opinnäytetyön tuloksia ja tehdä johtopäätökset tuloksista vastaamalla luvussa 4 esitettyihin tutkimuskysymyksiin. Kysymyksiin vastaamisen lisäksi arvioidaan työn tulosten luotettavuutta, esitetään ehdotuksia, miten työn tuloksia kannattaisi hyödyntää jatkotutkimuksissa sekä pohditaan koko opinnäytetyöprosessia ja sen onnistumista.

7.1 Tulosten tarkastelu

Työtä aloittaessa saimme käyttöömmme sytotoksisuustulokset, jotka osoittivat, ettei päälystämätön nanokokainen rautaoksidi ole kovin sytotoksista. Näiden tulosten perusteella tehtiin oletus, että se ei mahdollisesti ole myöskään erityisen genotoksista, sillä aikaisemmat tutkimustulokset antoivat ristiriitaista tietoa nanokokaisen rautaoksidin genotoksisuudesta. Oletus kävi osittain toteen, sillä edellisessä luvussa kuvailluista tuloksista käy ilmi, että matalilla pitoisuuksilla nanokokainen rautaoksidi ei aiheuta DNA- ja kromosomivaurioita. Sen voi kuitenkin todeta olevan mahdollisesti genotoksinen korkeammilla altistuspitoisuuksilla. Tuloksia tarkasteltaessa on otettava huomioon, että tämän opinnäytetyön tulokset ovat vasta alustavia tuloksia nanokokaisen rautaoksidin genotoksisuuden tutkimisessa *in vitro*, sillä kokeellisen osuuden toistoa ei vielä ole tehty.

Myöskään tässä työssä mikrotumamenetelmän yhteydessä laskettujen CBPI-indeksien perusteella nanokokaisen rautaoksidin ei voida todeta olevan sytotoksista käytetyillä pitoisuuksilla. Saadut CBPI-indeksit ovat verrattavissa aikaisempiin sytotoksisuustuloksiin (Liite 1). Tulokset vastaavat toisiaan: sytotoksisuustulosten perusteella voidaan todeta, ettei nanokokainen rautaoksidi ole juurikaan sytotoksista BEAS 2B -soluilla *in vitro* ja sama johtopäätös voidaan tehdä tämän työn tulosten perusteella. Solut jakautuvat kaikilla pitoisuuksilla normaalisti. Mikään pitoisuuksista ei myöskään CBPI-

indeksin kohdalla tilastollisessa analyysissä eroa merkittävästi toisista, joten nanokokoinen rautaoksidi ei ole tämän työn osalta sytotoksista 48 tunnin altistuksen jälkeen BEAS 2B -soluilla.

Komeettamenetelmässä tulokset ovat selkeästi noususuhdanteisia molempien altistusaikojen kohdalla. Kolmen tunnin altistuksen kohdalla DNA:n prosentuaalisen osuuden hännässä nousu pienimmästä arvosta korkeimpaan arvoon oli 1,56 prosenttiyksikköä ja 24 tunnin altistuksessa 2,12 prosenttiyksikköä. Tosin kolmen tunnin altistuksessa pienin arvo oli negatiivisen kontrollin sijaan pitoisuus 25 µg/ml. Korkeimman pitoisuuden kasvu verrattuna negatiiviseen kontrolliin oli 0,97 prosenttiyksikköä. Kuvaajien mukaan DNA-vauriot siis lisääntyvät pitoisuuden kasvaessa molemmilla altistusajoilla. Prosentuaalinen kasvu verrattuna negatiiviseen kontrolliin osoittaa myös äskeisen väitteen DNA-vaurioiden lisääntymisestä pitoisuuden kasvaessa. Kolmen tunnin altistuksessa mikään pitoisuuksista ei kuitenkaan eronnut merkitsevästi negatiivisesta kontrollista. 24 tunnin altistuksessa vain 500 ja 1000 µg/ml poikkesivat merkitsevästi ($p < 0,01$) negatiivisesta kontrollista. Tämän työn tulosten perusteella voidaan siis todeta, että kolmen tunnin altistuksessa nanokokoinen rautaoksidi ei mahdollisesti ole genotoksista ja 24 tunnin pituisessa altistuksessa se on mahdollisesti genotoksinen BEAS 2B -soluilla korkeimmilla pitoisuuksilla.

Komeettamenetelmässä mitattavat DNA-vauriot ovat mahdollisesti korjautuvia, jolloin 24 tunnin altistuksesta voidaan nähdä, onko osa vaurioista palautunut. Tässä huomataan, että nanokokoinen rautaoksidin kohdalla vauriot eivät ole palautuneet. Päinvastoin, ajan vaikutus DNA-vaurioiden lisääntymiseen on selkeästi havaittavissa. 24 tunnin altistuksessa DNA-vaurioita on selkeästi enemmän kuin kolmen tunnin altistuksessa. Esimerkiksi kuviosta 10 nähdään, että korkeimmalla pitoisuudella eroa kasvussa negatiiviseen kontrolliin verrattuna on 54,72 prosenttiyksikköä. Tämä saattaa perustua siihen, että osa nanomateriaaleista vaatii pidemmän ajan päästäkseen solun sisälle. Voidaan siis todeta altistuksen ajalla olevan tässä työssä merkitystä vaurioiden voimakkuuteen, sitä lisäävänä tekijänä.

Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella nanokokoinen rautaoksidi lisää mikrotumien muodostumista suuremmilla pitoisuuksilla. Tuloksista huomataan, että pitoisuuksilla 500 ja 1000 µg/ml mikrotumia on enemmän kuin keskimäärin muissa näytteissä. Tulosten perusteella voidaan todeta nanokokoinen rautaoksidin olevan mahdollisesti genotoksinen, aiheuttaen kromosomivaurioita BEAS 2B -soluille suuremmilla pitoisuuksilla.

48 tunnin altistuksen jälkeen. Tilastollinen analyysi vahvistaa tämän, sillä vain 500 ja 1000 µg/ml pitoisuudet erosivat merkitsevästi ($p < 0,05$) negatiivisesta kontrollista. Mikrotumien muodostuminen on pysyvä perimän vaurio, jota solut eivät voi korjata.

Päätelmiä tukevat myös tilastolliset analyysit: päällystämätön rautaoksidi voi aiheuttaa DNA-vaurioita ja kromosomivaurioita korkeimmilla pitoisuuksilla, sillä on olemassa biologisesti merkitsevä annosvaste. Komeettamenetelmässä sekä kolmen että 24 tunnin altistuksissa $p < 0,01$ ja mikrotumamenetelmän kohdalla $p < 0,05$.

Tämän *in vitro* -kokeen tulosten tarkastelun perusteella voidaan sanoa, että päällystämättömällä nanokokoisella rautaoksidilla altistetuissa BEAS 2B -keuhkoepiteelisoluissa havaitaan genotoksisia vaikutuksia vain korkeimmilla altistuspitoisuuksilla 500 ja 1000 µg/ml, kun altistuksesta on kulunut aikaa 24 tuntia tai enemmän. Koska, kuten luvussa 2.1 on mainittu, työterveydellisesti merkittävät nanokokoisien rautaoksidien pitoisuudet ovat alle 10 µg/ml, voidaan tämän työn tulosten perusteella alustavasti olettaa, ettei materiaalilla ole genotoksista vaikutusta työterveyden kannalta.

7.2 Luotettavuuden arviointi

Opinnäytetyössämme saatujen tulosten luotettavuus perustuu Työterveyslaitoksella käytössä oleviin ja toimivaksi havaittuihin menetelmiin. Oletuksena oli, että menetelmät toimivat oikein. Sekä komeettamenetelmässä, että mikrotumamenetelmässä käytettiin negatiivista ja positiivista kontrollia. Kontrollien tarkoituksena oli varmistaa käytettyjen menetelmien toimivuus.

Luvussa 6.1 ja 6.2 esiteltujen kontrollitulosten perusteella voidaan varmistaa käytettyjen menetelmien toimineen oikein. Komeettamenetelmän kohdalla kolmen sekä 24 tunnin altistuksissa H_2O_2 :n aiheuttamat vauriot olivat tilastollisesti merkitseviä ($p < 0,05$ ja $p < 0,01$), joten menetelmä toimi molemmilla altistusajoilla. Mikrotumamenetelmässä mitomysiini C:n aiheuttamat mikrotumat prosentteina ja CBPI-indeksi erosivat merkitsevästi ($p < 0,05$) nollanäytteistä, joten myös tämän menetelmän voidaan sanoa toimineen oikein.

Sekä komeetta- että mikrotumamenetelmässä suositellaan vähintään kolmen eri altistuspitoisuuden käyttöä kattavien tulosten saamiseksi. Tässä työssä käytettiin kahdeksaa eri pitoisuutta, jotka määritettiin sytotoksisuustulosten perusteella. Niinpä näyte-

määrän voi todeta olevan luotettava. Luotettavuutta lisäävänä tekijänä voidaan pitää myös rinnakkaisten näytteiden tekemistä sekä komeettamenetelmässä käytettyjä rinnakkaisia objektilaseja kustakin näytteestä.

Komeettamenetelmän rinnakkaisten näytteiden onnistuminen on nähtävillä tulososion kuviossa, joissa nähdään keskiarvovirheet. Virheet olivat pääasiassa melko pieniä, mutta kuviossa 9 kolmen tunnin altistuksessa pitoisuudessa 25 µg/ml ja 24 tunnin altistuksessa pitoisuudessa 1000 µg/ml ne olivat liian suuria, joka saa epäilemään näiden pitoisuuksien tuloksen luotettavuutta. Ensimmäisenä mainitun keskiarvo on kolmen tunnin altistuksessa alhaisin. Tähän arvoon ei voi luottaa täysin. Kuitenkin jälkimmäisen keskiarvo sijoittuu käyrällä luonnolliseen paikkaan, joten sitä voi pitää luotettavana.

Komeettamenetelmän kuvioista on havaittavissa, että kolmen tunnin altistuksessa pitoisuuksien DNA-hännän kasvu verrattuna negatiiviseen kontrolliin ensin hieman laskee ja sitten nousee korkeammaksi. Tämä johtuu mitä todennäköisimmin sattumasta, mutta sillä saattaa olla vaikutusta siihen, ettei mikään pitoisuus eronnut merkitsevästi negatiivisesta kontrollista. Näin ollen komeettamenetelmän kolmen tunnin aikapisteen tuloksiin tulee suhtautua kriittisesti. 24 tunnin altistuksessa kasvu on selkeää, mikä johti selkeään ja luotettavaan tulokseen.

Opinnäytetyössä käytetty nanokokoinen rautaoksidi oli säilytyksen aikana kuivunut. Tämä vaati materiaalin uudelleen liuottamisen ennen käyttöä. Materiaali saatiin sonikoinnin avulla liukenemaan hyvin 6 millilitraan steriiliä vettä, jossa oli 0,2 % BSA:ta. Tämän jälkeen tehtiin vielä käyttöliuokset BEGM:in, jotka jälleen sonikoitiin. DLS-tulokset kuitenkin paljastivat, että käyttöliuokset sisälsivät suuria partikkeleita ja partikkelikasvoja. Partikkeleiden pääsy soluun riippuu esimerkiksi niiden koosta. Pienemmät partikkelit otetaan solun sisään helpommin kuin suuret kasat. Koska partikkelikoko oli suurta ja nanokokoiset rautaoksidipartikkelit olivat kasautuneet, voidaan olettaa, että niitä ei ole otettu solun sisälle yhtä aktiivisesti kuin pieniä, yksittäisiä partikkeleita olisi otettu. Tällöin myös nanokokoisten rautaoksidipartikkeleiden genotoksinen vaikutus soluilla on voinut jäädä vähäisemmäksi, mitä se pienemmällä partikkelikoolla olisi ollut.

Sekä komeettamenetelmään, että mikrotumamenetelmään liittyy virhelähteitä. Komeettamenetelmän kannalta keskeistä on alkaliliuoksen pH, jonka on oltava yli 13. Mikäli pH on liian matala tai liian korkea, ei menetelmä toimi odotetulla tavalla. Käytössä ollut pH-mittari kalibroitiin aina ennen pH:n mittaamista, mutta sen antamasta pH lukemasta ei

ole täyttä varmuutta. PH-mittarin lukeman mukaan alkaliliuoksen pH:ssa päästiin 13 asti, mutta analysoitaessa soluja huomattiin, ettei komeettasoluille tyypillistä DNA-häntää ollut muodostunut, vaan soluista irronnut DNA oli kulkeutunut tasaisesti solun ympärille. DNA ei siis elektroforeesiajon aikana ajautunut selkeäksi hännäksi solun perään. Tämä on voinut johtua joko liian matalasta tai liian korkeasta pH:sta. Oletuksena on, että mikäli menetelmä olisi toiminut täysin oikealla tavalla ja soluilla olisi ollut selvästi erottuva DNA-häntä, erot DNA-vauriossa eri pitoisuuksien välillä olisivat voineet olla suuremmat. Tuloksien voi kuitenkin olettaa olevan luotettavat, sillä kaikilla objektilaseilla DNA on ajautunut samalla tavalla, jolloin lasit ovat keskenään vertailukelpoisia.

Komeettamenetelmän näytteet analysoi vain toinen tämän työn tekijöistä, mikä lisää tulosten objektiivisuutta. Näin kriteerit solujen valintaan olivat koko analysoinnin ajan samat. Tosin komeettamenetelmässä solujen valinnassa ei ole paljoa valinnan varaa, koska käytännössä kaikki järjestyksessä vastaan tulevat solut tuli kuvata. Kriteerit liittyivät siis lähinnä artefaktujen, esimerkiksi jäljelle jääneen materiaalin sekä vioittuneiden, analyysiin kelpaamattomien solujen tunnistamiseen analyysiin mukaan otettavista soluista.

Objektiivisen analyysin takaamiseksi sekä komeetta- että mikrotumamenetelmässä lasit koodattiin juoksevilla numeroilla. Analysointivaiheessa ei siis tiedetty mitä pitoisuutta kukin lasi sisältää, jotta tieto ei vaikuttaisi näytteiden analysointiin ja näin ollen tulosten luotettavuus lisääntyi.

Mikrotumamenetelmän haasteena oli lasien analysointi. Vaikka analysointi tehtiin kappaleessa 3.3. esitettyjen kriteerien mukaisesti, on mahdollista, että tekijöiden kriteerit solujen laskemiseen eroavat kuitenkin hieman toisistaan. Huolimatta siitä, että molemmat opinnäytetyöntekijät analysoivat näytteitä, toinen A-sarjan ja toinen B-sarjan, rinnakkaisten näytteiden tulokset olivat yhteneväisiä.

Mikrotumamenetelmän kaaviota tarkastellessa on otettava huomioon, että negatiivisen kontrollin normaali taso on sama kuin tässä pitoisuuksien 10–200 µg/ml taso, joten varsinaisia muutoksia on tapahtunut vasta korkeammilla pitoisuuksilla. Normaalilla tasolla tarkoitetaan tasoa, jolla negatiivinen kontrolli on ollut projektin muita materiaaleja tutkittaessa. Voi myös olla, että kaikkien pitoisuuksien taso on oikeasti korkeampi, kuin tämän työn tuloksissa. Tämä voi johtua siitä, että tekijöillä on kokemattomuuden vuoksi

ollut liian tiukat kriteerit mikrotumallisten solujen laskemisessa. Toisaalta kriteerit ovat kaikkien näytteiden kohdalla olleet samat, joten tuloksia voidaan pitää vertailukelpoisina.

Mikrotumamenetelmän CPBI-indeksissä (kuvio 4) arvot poikkesivat toisistaan. Alhaisin CPBI-indeksi saavutettiin pitoisuudessa 100 µg/ml, vaikka sytotoksisuustulosten perusteella annos ei ole juurikaan sytotoksinen. Tämä on kuitenkin voinut johtua siitä, että CPBI-indeksiä varten soluja laskettiin jokaisesta pitoisuudesta vain 100, yleisesti suositellun 500 sijaan. Lisäksi yksi-, kaksi- ja monitumaisten erottaminen oli välillä hankalaa. On mahdollista, että laskettaessa soluja, nelitumainen solu on laskettu kahdeksi kaksitumaiseksi, tai toisinpäin.

Koko opinnäytetyön toteutusvaiheen kannalta oleellista oli soluviljelyn, sekä solujen altistamisen onnistuminen. Soluviljelyn voidaan todeta onnistuneen, sillä solut kasvoivat elinvoimaisina ennen altistamista, eikä viljelypullojen havaittu kontaminoituneen missään vaiheessa. Altistamisen voidaan myös todeta onnistuneen, sillä eri pitoisuuksien tulosten välillä oli eroja ja tuloksista piirrettyjen kuvaajien käyrät olivat noususuhdanteisia.

7.3 Jatkotutkimukset

Sitä, mitä tästä opinnäytetyöstä saadut tulokset tarkoittavat käytännön toimien kannalta tai miten nanokokoinen rautaoksidi tulee ihmisen terveyteen vaikuttamaan, ei voida päätellä pelkästään tämän työn perusteella. Työ on hyödynnettävissä niin itse materiaalin jatkotutkimuksissa, kuin osana BRASINOEU-projektia ajatellen. Mitään niin suurta virhettä ei työtä tehdessä tapahtunut eikä luotettavuutta pohtiessa tullut ilmi sellaista virhelähdettä, etteivät opinnäytetyön tulokset nanokokoisien rautaoksidin genotoksisista vaikutuksista *in vitro* olisi hyödynnettävissä. Tulokset olivat toivottuja, vastasivat suurimmilta osin odotettuja tuloksia ja todettiin edellisessä alaluvussa pääpiirteissään luotettaviksi. Menetelmät toimivat toivotulla tavalla ja tulokset olivat selkeästi noususuhdanteisia, kuten työtä aloittaessa oletettiin.

Jotta nanokokoisien rautaoksidin toksisia vaikutuksia voidaan täysin luotettavasti tarkastella, on kolmen eri vaiheen tuloksia tarkasteltava kokonaisuutena. Sytotoksisuustutkimukset on tehty jo vuonna 2013 ja niiden tuloksia on hyödynnetty myös tämän opinnäytetyön toteutuksessa. *In vitro* -kokeet tulisi toistaa ainakin kerran ennen siirty-

mistä koe-eläimillä tehtäviin *in vivo* -kokeisiin. Jos kahden ensimmäisen *in vitro* -kokeen tulokset poikkeavat liikaa toisistaan, toistetaan kokeet vielä kolmannen kerran. Toisto on osa genotoksisuuden arvioimisen protokollaa. Mutta kuten tämän työn tulosten luotettavuuden arvioimisesta huomaa, on luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä niin paljon, että se olisi muutenkin suositeltavaa.

Vaikka *in vitro* -kokeet antavat suuntaa nanokokoisen rautaoksidin syto- ja genotoksisista vaikutuksista, eivät ne yksinään riitä antamaan kattavaa kuvaa materiaalin toksisuudesta elävissä organismeissa. *In vitro* -kokeiden hyötynä on yhden asian tarkastelun mahdollisuus pelkistetyissä laboratorio-olosuhteissa. *In vivo* -kokeet taas antavat paljon kattavamman kuvan koko elimistön toiminnan vaikutuksista ja ne mahdollistavat usean eri vaikutuksen samanaikaisen tarkastelun. *In vivo* -kokeet tullaan BRASINOEU -projektin puitteissa tekemään ennen lopullisten nanokokoisen rautaoksidin mahdollisten genotoksisten vaikutusten raportoimista ja arvioimista.

Kattavia tuloksia nanokokoisen rautaoksidin genotoksisuudesta voisi hyödyntää tutkimalla juuri tämän materiaalin kanssa työskentelevien ja koko BRASINOEU-projektin tuloksia tutkimalla muidenkin nanomateriaalien kanssa työskentelevien työolosuhteita. Tutkimuksen aihe voisi olla esimerkiksi materiaalilta suojautuminen. Voitaisiin selvittää millaisille pitoisuuksille materiaaleja työpaikoilla altistutaan, miten työpaikoilla suojaudutaan materiaaleilta, jos sille on tarvetta ja miten tätä suojautumista voisi tehostaa. Tieto nanokokoisen rautaoksidin mahdollisista terveydelle haitallisista vaikutuksista auttaa työturvallisuuden parantamisessa, sekä terveyshaittojen estämisessä.

7.4 Lopuksi

Opinnäytetyön toteutus oli haastavaa, sillä kaikki työssä käytetyt menetelmät olivat tekijöille täysin uusia. Asiantuntevalla opastuksella ja hyvillä ohjeilla työn tekeminen onnistui kuitenkin suurimmaksi osaksi itsenäisesti. Prosessi oli mielenkiintoinen ja sen aikana oppi erittäin paljon bioanalyytikon työssä tarvittavia taitoja, erityisesti kokemus soluviljelystä on varmasti hyödyllinen tulevassa ammatissa.

Koejärjestelyt olivat lopulta onnistuneet, vaikka kaikki ei sujunutkaan juuri niin kuin oli suunniteltu. Kokeellinen osuus saatiin järjestettyä hieman kompromisseja ja uusia järjestelyjä tehden. Aikataulussa oli onneksi joustamisen varaa, joten uudet järjestelyt

eivät haitanneet etenemistä. Kokonaisuutena opinnäytetyöprosessi sujui hyvin, loppu-tulos oli onnistunut sekä tulokset toivottuja ja hyödynnettävissä jatkoa ajatellen.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, aiheuttaako nanokokoinen rautaoksidi genotoksisia vaikutuksia ihmisen BEAS 2B – keuhkoepiteelisoluissa. Tavoitteena oli saada mahdollisimman luotettavat tulokset. Tällä opinnäytetyölle asetetut tavoitteet täyttyivät.

Lähteet

Aardema, Marilyn J. – Kirsch-Volders, Micheline. 2001. The in vitro micronucleus assay. Teoksessa Wai Nang Choy (toim.): Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker Inc. New York. 163-186.

ATCC. 2010. Passage number effects in cell lines. Verkkodokumentti. <<http://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb07.ashx>>. Luettu 26.10.2014.

Azqueta, Amaya – Shaposhnikov, Sergey – Collins, Andrew R. 2011. DNA repair measured by the comet assay. Teoksessa Kruman, Inna (toim.): DNA repair. InTech. 615-636. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.intechopen.com/books/dna-repair/dna-repair-measured-by-the-comet-assay>>. Luettu 29.10.2014.

Bhattacharya, Kunal – Hoffmann, Eik – Schins, Roel F. P – Boertz, Jens – Prantl, Eva-Maria – Alink, Gerrit M. – Byrne, Hugh James – Kuhlbusch, Thomas A.J. – Rahman, Qamar – Wiggers, Hartmut – Schulz, Christof – Dopp, Elke. 2012. Comparison of Micro- and Nanoscale Fe+3-Containing (Hematite) Particles for Their Toxicological Properties in Human Lung Cells In Vitro. Toxicological Sciences 126(1). 173-182.

BRASINOEU. Translocation and safe design of surface engineered metal oxide nanoparticles. Seventh framework programme. Marie Curie actions. International research staff exchange scheme. Description of work.

Brennan, John. 2014. What are the effects of an alkaline pH on the structure of DNA? Verkkodokumentti. <http://www.ehow.com/info_12030337_effects-alkaline-ph-structure-dna.html>. Luettu 20.10.2014.

Catalán, Julia – Suhonen, Satu – Huk, Anna – Dusinska, Maria. 2014. Analysis of nanoparticle-induced DNA damage by the comet assay. Teoksessa Sierra, L. María – Gaivão, Isabel (toim.): Genotoxicity and DNA repair: A practical approach. New York: Humana Press, Springer. 241-268.

Ersson, Clara. 2011. International validation of the comet assay and human intervention study. The Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Euroopan komissio. 2011. Mitä nanomateriaalit ovat? Euroopan komissiolta uraa uurtava yleinen määritelmä. Lehdistötiedote. <http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_fi.htm>. Luettu 15.9.2014.

Fenech, Michael. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 455: 81-95. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/mn1.pdf>>. Luettu 26.10.2014.

Fenech, M – Chang, W.P. – Kirsch-Volders, M. – Holland, N. – Bonassi, S. – Zeiger, E. 2003. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation Research 534: 65-75.

Fenech, Michael. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols 2 (5): 1084-1104.

Fenech, M. – Kirsch-Volders, M. – Natarajan, A.T. – Surrallès, J. – Crott, J. W. – Parry, J. – Norppa, H. – Eastmond, D.A. – Tucker, D.A. – Thomas, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1): 125-132. Saatavilla myös verkossa: <<http://mutage.oxfordjournals.org/content/26/1/125.full>>. Luettu 26.10.2014.

Freshney, R. Ian. 2005. *Culture of animal cells: A manual of basic techniques*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Freyria, Francesca Stefania – Bonelli, Barbara – Gazzano, Elena – Garrone, Edoardo – Ghiazza, Mara – Ghigo, Dario – Fubini, Bice – Tomatita, Maura. 2012. Hematite nanoparticles larger than 90 nm show no sign of toxicity in terms of lactate dehydrogenase release, nitric oxide generation, apoptosis, and comet assay in murine alveolar macrophages and human lung epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology*: 850-861.

Gupta, Ajay Kumar – Gupta, Mona. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (18): 3995-4021. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204009317?np=y>>. Luettu 17.10.2014.

Hurme, Tuure. 2011. Pienenpieni nano on suuri tekijä. Verkkodokumentti. <http://tyopiste.ttl.fi/Uutiset/Sivut/Pienenpieni_nano_on_suuri_tekija.aspx>. Luettu 26.10.2014.

Kettiger, Helene – Schipanski, Angela – Wick, Peter – Huwyler, Jörg. 2013. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International Journal of Nanomedicine* 8: 3255-3269. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.dovepress.com/engineered-nanomaterial-uptake-and-tissue-distribution-from-cell-to-or-peer-reviewed-article-IJN>>. Luettu 24.10.2014.

Kirsch-Volders, Micheline – Sofuni, Toshio – Aardema, Marilyn – Albertini, Silvio – Eastmond, David – Fenech, Michael – Ishidate, Motoi Jr. – Lorge, Elisabeth – Norppa, Hannu – Surrallès, Jordi – von der Hude, Wilhelm – Wakata, Akihiro. 2000. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 167–172. Saatavilla myös verkossa: <http://www.researchgate.net/profile/Hannu_Norppa/publication/12578218_Report_from_the_In_Vitro_Micronucleus_Assay_Working_Group/links/00b495151523a00552000000>. Luettu 20.10.2014.

Laiho, Marikki. 2002. Miten syöpä syntyy. Lääketieteellinen Aikakaus-kirja Duodecim 118 (2012): 1751–1758. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo93129.pdf>>. Luettu 17.10.2014.

Landsiedel, R. - Kapp, MD - Schulz, M.- Wiench, K - Oesch, F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations - many questions, some answers. *Mutation Research*. 681 (2-3): 241-258. Saatavilla myös verkossa: <www.ncbi.nlm.gov/pubmed/19041420>. Luettu 25.10.2014

Life Technologies. Cell culture basics. Verkkodokumentti. <<http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html?cid=fl-cellculturebasics>>. Luettu 28.10.2014

Life Technologies. DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride). Verkkodokumentti. <<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D1306>>. Luettu 28.10.2014

Lobo, V. – Patil, A. – Phatak, A. – Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4 (8). 118-126. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>> Luettu 25.10.2014.

Lonza. Media - BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium. Verkkodokumentti. <<http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-and-stem-cells/human-cells-and-media/airway-cells-and-media/begm-bronchial-epithelial-cell-growthmedium.aspx>>. Luettu 16.10.2014.

LS Instruments. Dynamic Light Scattering: Measuring the particle size distribution. Verkkodokumentti. <http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/>. Luettu 22.9.2014.

Migliore, Lucia – Di Bucchianico, Sebastiano – Uboldi, Chiara. 2014. The in vitro micronucleus assay and FISH analysis. Teoksessa Sierra, L. María – Gaivão, Isabel (toim.): *Genotoxicity and DNA repair: A practical approach*. New York: Humana Press, Springer. 73-102.

Minissi, Sandra - Gustavino, Bianca - Degrassi, Franesca - Tanzarella, Caterina - Rizzoni, Marco. 1999. Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis* 14 (1): 43-49. Saatavilla myös verkossa: <<http://mutage.oxfordjournals.org/content/14/1/43.full>> Luettu 1.10.2014.

Nexcelom Bioscience. 2014. Using Trypan Blue and acridine orange/propidium iodide to measure cell viability. Verkkodokumentti. <<http://www.nexcelom.com/Applications/measure-cell-viability-using-trypan-blue-or-AOPI.php>>. Luettu 16.10.2014.

OECD. 2012. OECD Guideline for testing of chemicals: Proposal for updating test guideline 487 in vitro mammalian cell micronucleus test. Verkkodokumentti. <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG487%20Oct%202012%20updated%2029oct.pdf>>. Luettu 20.10.2014.

Rozgaj, Ruzica – Kasuba, Vilena – Mladinic, Marin – Kopjar, Nevenka – Micek, Vedran – Zeljezic, Davor. 2014. Genotoxicity assessment of iron oxide nanoparticles in male wistar rats after chronic oral treatment. *Toxicology Letters* 229 (supplement): 197. Saatavilla myös verkossa: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427414009187?np=y>>. Luettu 22.10.2014.

Savolainen K – Vainio H: Synteettisten nanohiukkasten ja nanoteknologian riskit. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 127 (2011) 11: 1097–1104.

Singh, Shailendra Pratap – Rahman, M.F. – Murty, U.S.N. – Mahboob, M. – Grover Paramjit. 2013. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. Toxicology and Applied Pharmacology 226 (1): 56-66. Saatavilla myös verkossa:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X12004589?np=y#bb0085>>
. Luettu 22.10.2014.

Solunetti. 2006. Fluoresenssimikroskopia. Verkkodokumentti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/>>. Luettu 18.9.2014.

Stimpson, Kaitlin M. – Matheny, Justyne E. – Sullivan, Beth A. 2012. Disentric Chromosomes: Unique models to study centromere function and inactivation. Duke Center of Genomic and Computational Biology. Verkkodokumentti.
<<http://www.genome.duke.edu/labs/sullivanlab/publications/StimpsonMathenySullivanCR2012.pdf>>. Luettu 14.10.2014.

Teja, Aryn S. – Koh, Pei-Yoong. 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 55 (1–2): 22–45. Saatavilla myös verkossa:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960897408000168?np=y>>. Luettu 17.10.2014.

Teknokemian yhdistys ry. Kosmetiikan nanomateriaalit. Verkkodokumentti.
<http://www.teknokemia.fi/fin/kosmetiikka/kosmetiikan_puheenaiheita/nanomateriaalit_kosmetiikassa/>. Luettu 16.10.2014.

Tice, R. R. – Agurell, E. – Anderson, D. – Burlinson, B. – Hartmann, A. – Kobayashi, H. – Miyamae, Y. – Rojas, E. – Ryu, J.-C. – Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 35: 206-221.

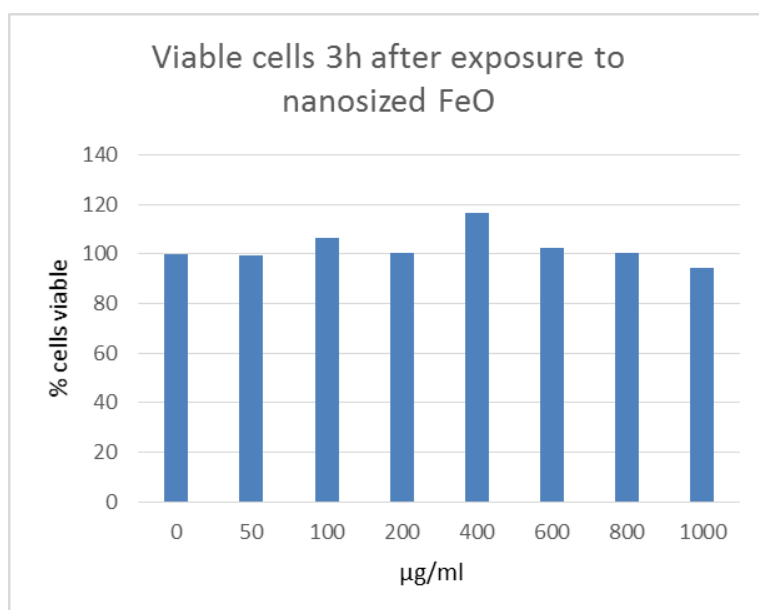
Työterveyslaitos. Nanoturvallisuuskeskus. Nanomateriaalit. Verkkodokumentti.
<<http://www.ttl.fi/partner/nanoturvallisuuskeskus/Sivut/default.aspx>> Luettu 10.10.2014.

Vogel, Ulla – Savolainen, Kai – Wu, Qinglan – van Tongeren, Martie – Brouwer, Derk – Berges, Markus. 2014. Handbook of nanosafety: Measurement, exposure and toxicology. Elsevier Inc.

Nanokokoisen rautaoksidin sytotoksisuustulokset

Nanokokoisen rautaoksidin sytotoksisuustutkimukset on tehty TrypanBlue- menetelmällä Työterveyslaitoksen nanoturvallisuuskeskuksen laboratoriossa syksyllä 2013.

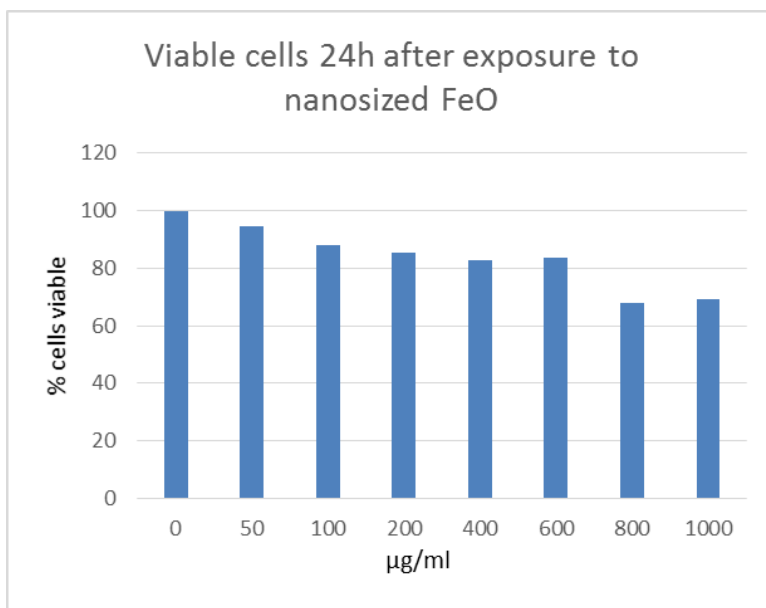
Kuviossa 13 elossa olevien solujen määrää prosentteina on verrattu nollanäytteeseen (100 %). Eniten elossa olevia soluja on 400 µg/ml pitoisuudessa (117 %) ja vähiten 1000 µg/ml pitoisuudessa (95 %). Kolmen tunnin jälkeen rautaoksidialtistuksesta ei ole havaittavissa sytotoksisuutta.



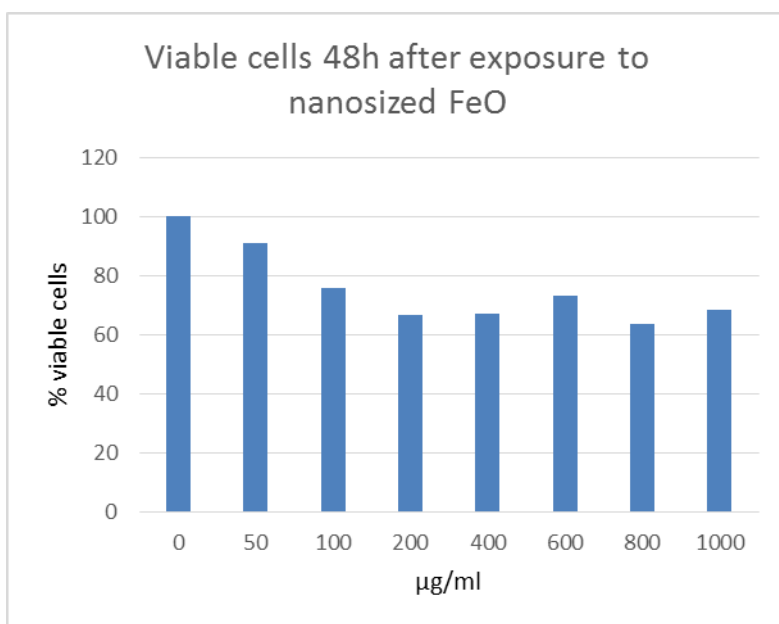
Kuvio 15. Elossa olevat solut kolme tuntia rautaoksidialtistuksen jälkeen.

Kuviossa 14 elossa olevien solujen määrää prosentteina on verrattu nollanäytteeseen (100 %). Eniten elossa olevia soluja on nollanäytteessä (100 %) ja vähiten 800 µg/ml pitoisuudessa (68 %). 24 tunnin jälkeen rautaoksidialtistuksesta on havaittavissa hie-
man sytotoksisuutta joka kasvaa melko tasaisesti suurimpia pitoisuuksia kohden.

Kuviossa 15 elossa olevien solujen määrää prosentteina on verrattu nollanäytteeseen (100 %). Eniten elossa olevia soluja on nollanäytteessä (100 %) ja vähiten 800 µg/ml pitoisuudessa (63 %). 48 tunnin jälkeen rautaoksidialtistuksesta on havaittavissa hie-
man sytotoksisuutta. Sytotoksisuus kasvaa alemmilla pitoisuuksilla aina 200 µg/ml asti, jonka jälkeen pysyy melko tasaisena.



Kuvio 16. Elossa olevat solut 24 tuntia rautaoksidialtistuksen jälkeen.



Kuvio 17. Elossa olevat solut 48 tuntia rautaoksidialtistuksen jälkeen.

Yleisesti voidaan päätellä, että pidempi altistusaika aiheuttaa sytotoksisuutta myös pienemmillä pitoisuuksilla. Kuitenkin, rautaoksidi ei ole kovin sytotoksista, sillä se saavuttaa tässä suurimman sytotoksisuutensa 48 tunnin jälkeen altistuksesta 800 µg/ml pitoisuudessa, jossa solujen eloonjäämisprosentti on 63 %.

Altistuksessa käytetyt laimennokset

Taulukko 1. Komeettamenetelmässä käytetyt laimennokset

COMET				Dilution	
Exposure medium needed ml	Dose µg/ml	Stock concentration µg/ml	Stock needed ml	Stock µl	Medium µl
2,5	10	2000	0,0125	13	2488
2,5	25	2000	0,03125	31	2469
2,5	50	2000	0,0625	63	2438
2,5	100	2000	0,125	125	2375
2,5	150	2000	0,1875	188	2313
2,5	200	2000	0,25	250	2250
2,5	500	2000	0,625	625	1875
2,5	1000	2000	1,25	1250	1250

TOTAL

2,54375

→ sonicate 6 ml

Taulukko 2. Mikrotumamenetelmässä käytetyt laimennokset

MN				Dilution	
Exposure medium needed ml	Dose µg/ml	Stock concentration µg/ml	Stock needed ml	Stock µl	Medium µl
14	10	2000	0,07	70	13930
14	25	2000	0,175	175	13825
14	50	2000	0,35	350	13650
14	100	2000	0,7	700	13300
14	150	2000	1,05	1050	12950
14	200	2000	1,4	1400	12600
14	500	2000	3,5	3500	10500
14	1000	2000	7	7000	7000

TOTAL

14,245

→ sonicate 3 x 6 ml → pool

Taulukko 3. Sytokalasiini C:n laimennos

Cyt B

Exposure medium needed ml	Dose µg/ml	Stock concentration µg/ml	Stock needed ml	Stock µl
6,6	9	2000	0,0298	29,8

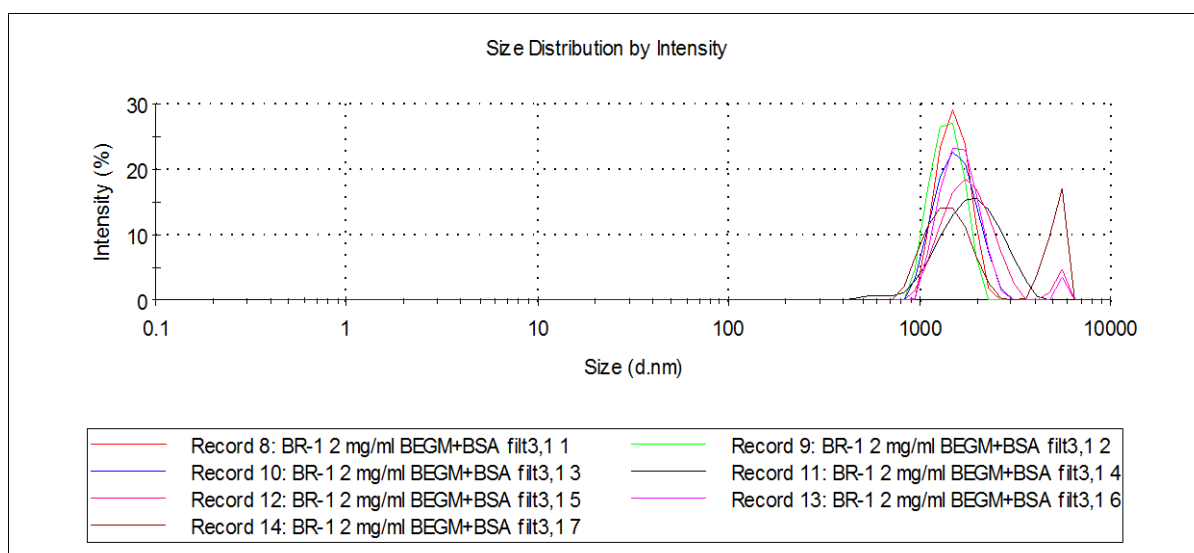
Nanokokoisen rautaoksidin DLS-tulokset

BRASINOEU BR1-P DLS tulokset

27.8.2014

DSL-tutkimukset nanokoisella rautaoksidilla on tehnyt Työterveyslaitoksen nanoturvallisuuskeskuksen tutkija Kirsi Siivola.

Kuviossa 18 mitattu liuos on BR-1-P:a (päälystämätöntä nanokokoista rautaoksidia) 2 mg/ml seerumillisessa BEGM:ssa. Mittaus on tehty sonikoinnin jälkeen. Sonikoinnin tarkoituksena on ultraäänen avulla hajottaa kasautuneita partikkeleja. Lisäksi mahdollisten jäljelle jääneiden ryhmittyneiden/kasautuneiden partikkeliin poisto on tehty 3,1 µm suodattimella juuri ennen mittausta.

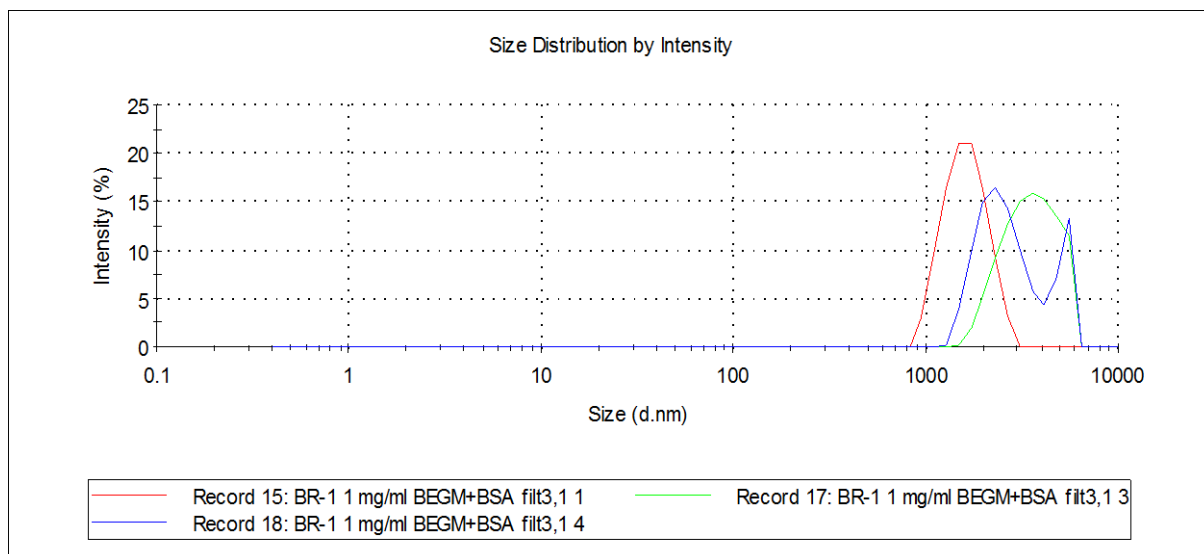


Kuvio 18. DLS-kuvaaja BR-1-P 2 mg/ml seerumillisessa BEGM:ssa

Tulosten laatu on huonoa, sillä dispersio sisältää suuria sedimentoituneita partikkeleita sekä partikkelikasaumia mittauksen aikana, nousten jopa 45,9 %:in. Jakautumisen analyysi (kuvaajat) ei mahdollisesti ole tarkkaa tulosten laadun vuoksi. Kuvaajassa näkyy tulosten jakautuminen yksittäisinä mittaustuloksina.

Kuviossa 19 mitattu liuos on BR-1-P:a (päälystämätöntä nanokokoista rautaoksidia) 1 mg/ml seerumillisessa BEGM:ssa. Mittaus on tehty sonikoinnin jälkeen. Sonikoinnin tarkoituksena on ultraäänen avulla hajottaa kasautuneita partikkeleja. Lisäksi mahdollisten jäljelle jääneiden ryhmittyneiden/kasautuneiden partikkeliin poisto on tehty 3,1 µm suodattimella juuri ennen mittausta.

µm suodattimella juuri ennen mittausta. Vortexoinnilla eli liuoksen sekoittamisella oli hyvin vähän vaikutusta partikkelien kokojakaumaan.



Kuvio 19. DSL-kuvaaja BR-1-P 1 mg/ml seerumillisessa BEGM:ssa

Tulosten laatu on huonoa, sillä dispersio sisältää suuria sedimentoituneita partikkeleja sekä partikkelikasaumia mittauksen aikana, nousten jopa 50,7 %:in. Jakautumisen analyysi (kuvaajat) ei mahdollisesti ole tarkkaa tulosten laadun vuoksi. Kuvaajassa näkyy tulosten jakautuminen yksittäisinä mittaustuloksina. Mittaustulokset, jotka olivat selvästi riittämättömiä jakauman analyysiin, hylättiin.

Komeettamenetelmän työohje ja materiaalit

IN VITRO COMET ASSAY

Exposure and harvest of cells:

1. Subculture 120 000 BEAS 2B cells/well/1ml on 24-well plates and incubate them at 37°C (5 % CO₂) for 24 hours.
2. Change medium and add treatment material (0,5ml/well) and incubate at 37°C (5 % CO₂) for 3 hours and 24 hours.
3. Remove the media and briefly rinse the cells with 0,5 ml of PBS.
4. Add 0,25 ml/well of Trypsin-EDTA solution and incubate cells at 37°C (5 % CO₂) until the cell layer is dispersed = 20minutes.
5. Add 1 ml of cold (+ 4 °C) trypsin inhibitor and transfer cell suspension to a centrifuge tube cold on ice.
6. Centrifuge 1100rpm for 5minutes, remove and discard the medium. Keep the cells cold on ice until embedding on slides.

Embedding of cells:

1. Mix cells with 380 µl (count: ~10000 cells in 5µl) warm (+ 37°C) LMPA (low melting point agarose) one sample at a time; and immediately pipet 60µl on a dry slide prepared earlier. Add coverslip (24 x 40 mm) and place the slide on a slide tray resting on the ice packs. Let the slide lay there until the agarose layer hardens (~5 to 15 minutes).
2. Remove coverslip and slowly lower slide into cold, freshly made Lysing Solution. Refrigerate for overnight (a minimum of 1 h).

NOTE: - The amounts indicated are based on using 24 x 40 mm coverslips.
 - Embedding of cells and electrophoresis and analysis of slides has to be performed under yellow light to prevent DNA-damage.

Electrophoresis and analysis of slides:

1. After overnight at + 4°C, gently remove slides from the Lysing Solution. Place slides in coplin jars containing freshly made cold pH>13 Electrophoresis Buffer and let them

sit there for 20 minutes to allow for unwinding of the DNA and the expression of alkali-labile damage.

2. Remove slides from coplin jars and place them side by side on the horizontal gel box near one end, sliding them as close together as possible. Fill the buffer reservoirs with freshly made cold pH>13 Electrophoresis Buffer until the liquid level completely covers the slides, 800 ml for one box. Avoid bubbles over the agarose. Remove bubbles if necessary.

3. Turn on power supply to ~0.74 V/cm and adjust the current to 300 mill amperes by raising or lowering the buffer level. Electrophorese the slides for 15 minutes.

4. Turn off the power. Gently lift the slides from the buffer and place on a drain tray with absorbent paper. Dropwise, using a Pasteur pipette, coat the slides with Neutralization Buffer and let sit for ~5 minutes. Drain slides by carefully tilting them and repeat two more times.

5. After third neutralization treatment drain slides, rinse by dipping in deionized water and allow air drying. Store slides in dry place and avoid light.

6. When convenient, add 40µl of 1x Ethidium Bromide. And to ensure even hydration and staining cover slide with a fresh coverslip (24 x 50 mm). Before viewing slides, blot away excess liquid on the back and edges. View slides under fluorescence microscope using image analysis program, Komet 5.5 for measurements. It is important to wear gloves especially while working with Ethidium Bromide because of it is carcinogenetic.

7. After scoring, remove coverslip, let dry, and store at room temperature, avoid light.

Reagents and materials for in vitro comet assay:

Materials:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1. BEGM BulletKit | 16. Sodium Hydroxide (NaOH) |
| 2. Bovine Serum Albumin (BSA) | 17. Triton X-100 |
| 3. Disodium EDTA (Titrplex III) | 18. Trizma Base |
| 4. dPBS (Ca++, Mg++ free) | 19. Trypsin 0,05% - EDTA 1x |
| 5. Ethanol 100% | 20. Cell culture flasks |
| 6. Ethidium Bromide | 21. Centrifuge |
| 7. Foetal Bovine Serum (FBS) | 22. Centrifuge Tubes (50ml) |
| 8. H2O (distilled/deionised) | 23. Centrifuge tubes (conical, 14ml) |
| 9. Hydrochloric acid (HCl) | 24. Centrifuge tubes (conical, sterile, 11ml) |
| 10. Low Melting Point Agarose (LMPA) | 25. CO2 incubator +37°C, 5% CO, 80% humidity |
| 11. Normal Melting Agarose (NMA) | 26. Coplin jars |
| 12. PBS (Ca++, Mg++ free) | 27. Coverslips (No. 1, 24 x 40 mm) |
| 13. Penicillin/Streptomycin (P/S) | 28. Culture tubes (round bottom, sterile, 14ml) |
| 14. RPMI 1640 | 29. Digital microscope |
| 15. Sodium Chloride (NaCl) | 30. Fluorescence microscope (Axioplan 2) |

- | | |
|---|--|
| 31. Frozen Ice Packs | 39. Microscope Slides, Conventional |
| 32. Glass tubes (sterile, round bottom, 10ml, 30ml) | 40. Multidishes (Nunclon surface, sterile, 24 wells) |
| 33. Hemacytometer | 41. Permanent Marker for labeling slides |
| 34. Horizontal Electrophoresis Tank(s) | 42. Pincers |
| 35. Ice | 43. Power Unit |
| 36. Komet 5,5 (Imaging program, Andor Bioimaging) | 44. Sonicator USA) |
| 37. Micropipettor and Tips | 45. Syringe Filter 0,2µm |
| 38. Microscope Slide Tray (e.g. cardboard) | 46. Waterbath +37°C |

Reagents:

.

1. Exposure and harvest of cells:

Maintenance medium (BEGM to BEAS 2B cells):

BEBM + Supplements

Exposure medium:

BEGM + BSA 0,6mg/ml

Trypsin inhibitor:

RPMI 1640 500ml

FBS 55ml

P/S 5ml

Dispersions:

Weigh material to a glass tube and dilute it to exposure medium to form the concentration of 2mg/ml (a stock solution).

Sonicate this stock for 20 minutes. After sonication prepare serial dilutions and sonicate these final dilutions in 37°C for 20 minutes.

Vortex dispersion briefly, just before pipetting it on cells.

2. Embedding of cells:

0,7% LMPA

LMPA 0,7g

PBS 100ml

Microwave or heat until near boiling and the agarose dissolves.

Aliquot 25 ml samples into 50ml centrifuge tubes and refrigerate until needed.

When needed, briefly melt agarose in microwave or by another appropriate method.

Place LMPA vial in a 37°C water bath to cool and stabilize the temperature.

1,5% NMA for dry slides

NMA 1,5g

PBS 100ml

Microwave or heat until the agarose dissolves.

Preparation of dry slides

While NMA agarose is hot, dip conventional slides up to one-half the frosted area and gently remove.

Wipe underside of slide to remove agarose and lay the slide in a tray on a flat surface to dry.

The slides may be air dried or warmed for quicker drying. Store the slides at room temperature until needed; avoid high humidity conditions.

Prepare slides a week / weeks before use.

Lysing Solution (1000ml):

NaCl 146,1g

EDTA 37,2g

Trizma base 1,2g

dH₂O q.s to 990ml

Begin stirring

NaOH 7g

Allow the mixture to dissolve.

Adjust the pH to 10,0 using solid NaOH (1-3g).

Filter sterilize.

Store at room temperature.

Final lysing solution:

Add 1% Triton X-100, then refrigerate for at least 30 minutes prior to slide addition.

3. Electrophoresis and analysis of slides

Electrophoresis Buffer (300 mM NaOH / 1 mM EDTA):**Stock solutions:**10N NaOH:

NaOH 200g

dH₂O 500ml200mM EDTA:

EDTA 14,89g

dH₂O 200ml

adjust pH to 10,0 (10N NaOH)

Store both at room temperature.

Prepare the NaOH and EDTA stock solutions every ~2 weeks.

1X Buffer - prepare from stock solutions:

Make fresh before each electrophoresis run.

10N NaOH 45ml

200mM EDTA 5ml

dH₂O q.s. 1000ml

Mix well.

Prior to use, measure the pH of the buffer to ensure >13.

The total volume depends on the gel box capacity

Neutralization Buffer:

Tris 48,5g

dH₂O 900ml

Adjust pH to 7,5 with concentrated (>10M) HCl.

dH₂O q.s. to 1000ml

Store at room temperature.

Staining Solution:Add one drop of Ethidium Bromide to 12,5ml dH₂O

Filter sterilize

Store at room temperature.

CAUTION: Handle dyes appropriately!

NOTE : Sybr Green or Sybr Safe can be used instead of Ethidium Bromide.

Mikrotumamenetelmän työohje

MICRONUCLEUS ASSAY IN VITRO

Subculture cells in T25 flasks, seeding 1 days prior to exposure. BEAS 2B: 1000000 cells/flask in BEGM medium.

Add Cyt-B after 6h of exposure: Stock solution 2 mg/ml, final concentration 9 µg/ml $X \cdot 2000 \mu\text{g/ml} = 9 \mu\text{g/ml} \cdot 6,6 \text{ ml}$, $X = 29,8 \mu\text{l/flask}$

Pipette cyt-B towards the surface of the cells, shake carefully by hand and put back the flasks in 37°C incubator.

After 48 h exposure

- Put trypsin-EDTA, PBS, PBS/10% fetal bovine serum (FBS) (has to be prepared) in 37°C water bath, prepare hypotonic solution (50% RPMI 1640 + 50% distilled water) and put in RT.
- Remove the medium from the flasks.
- Wash the cells with 5 ml PBS/flask, remove PBS. Repeat.
- Add 1 ml trypsin-EDTA/flask, incubate the flasks in 37°C for about 20 min.
- Check in the microscope that the cells really have detached from the bottom of the flask because often the exposed cells can stick quite hard to the bottom (if this happens the flask can be put again in 37°C for some minutes/or try to gently hit the sides/bottom of the flask to get them detached).
- Add 3-4 ml PBS/10% FBS per flask.
- Move the cell suspension to a 15 ml Falcon tube.
- Centrifuge at 1100 rpm for 6 min.
- Remove supernatant, break the cell pellets and add 6 ml PBS.
- Centrifuge at 11000 rpm for 6 min, remove supernatant and break the cell pellets.

Hypotonic treatment and fixation

Prepare the fixation solutions, so that they are ready before you start the hypotonic treatment:

- **fix 1:** methanol: acetic acid, 3:1; in a bottle with automatic doser.

- **fix 2:** methanol 97% + acetic acid 3%; in a bottle with automatic doser.
- Add about 5 ml of hypotonic solution/tube vigorously (pipette very fast, important to be quick) and incubate for 2 min in RT.
- Centrifuge at 1100 rpm for 5 min.
- Remove the supernatant, carefully break the pellets (it's important to break all the cell clots either by "hitting" the bottom/side of the tube with your fingers or by using Pasteur pipets) and slowly add 0.5 ml of fix 1, then add fix 1 up to 5 ml.
- Centrifuge at 1100 rpm for 5 min, remove supernatant and break the cell pellets.
- Add 4 ml of fix 1, centrifuge at 1100 rpm for 5 min, remove supernatant and break cell pellets.
- Add 5 ml of fix 2, centrifuge, remove supernatant, break cell pellets.
- Carefully add drops of fix 2 (if you want to prepare the slides immediately add a few drops of fix 2/or if you want to prepare slides later add about 5-10 ml fix 2 and put the suspension in -20°C).
- If slides are prepared directly:
 - add drops of fix 2 in the tube (so that the suspension is greyish)
 - drop 1-2 drops on a microscopic slide
 - keep the slide in an angle and let the drops run down the glass
 - check the slides in microscope, the cells should not be too dense (if too dense add more of fix 2)
 - make 3-4 slides for each exposure, let them dry in RT
 - put the left over cell suspension in the freezer
- if you want to use them later:
 - first centrifuge them
 - remove supernatant
 - add drops of fix 2
 - follow the instructions above

Acridine orange (AO)/DAPI staining of slides

- Stain the slides in AO working solution for 1 min (in cuvettes).
- Wash with Sørensen buffer, 3 x 3 min (in cuvettes).
- Drop 1-2 drops of DAPI (1 µg/ml) on the slides and cover with coverslips - > 5 min incubation.

- Take off the coverslips and rinse under running tap water.
- Let the slides dry in upright position out of light.

Preparation of Acridine orange:

Stock solution: 0.1% in water, store at 4°C.

Working solution: 1 part of stock solution and 30 parts of Sörensen buffer, pH 6.8

Preparation of Sörensen buffer:

Solution A: 18.15 g KH_2PO_4 /2000 ml H_2O (store in RT)

Solution B: 23.74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ /2000 ml H_2O (store in RT)

Sörensen buffer, pH 6.8 (pH doesn't have to be measured): to make 100 ml; 53.4 ml of solution A + 46.6 ml of solution B

Microscoping

- Drop 1-2 drops of Sörensen buffer on the slide and place the coverslip on just before microscoping.
- Store the slides in the refrigerator without coverslips.

Komeettamenetelmän numeeriset tulokset

Taulukko 5. Komeettamenetelmän tulokset kolme tuntia altistuksesta 27.8.2014.

dose	0	10	25	50	100	150	200	500	1000	H ₂ O ₂ 3h
A	3,919	3,289	3,322	2,937	3,4	3,319	4,145	4,052	4,665	5,119
B	3,346	2,88	2,479	3,145	3,279	3,438	4,205	4,309	4,261	6,744
average	3,6325	3,0845	2,9005	3,041	3,3395	3,3785	4,175	4,1805	4,463	5,9315
SD	0,2865	0,2045	0,4215	0,104	0,0605	0,0595	0,03	0,1285	0,202	0,8125
%	100	84,91397	79,84859	83,71645	91,93393	93,00757	114,9346	115,086	122,863	163,2897

Taulukko 6. Komeettamenetelmän tulokset 24 tuntia altistuksesta 28.8.2014.

dose	0	10	25	50	100	150	200	500	1000	H ₂ O ₂ 24h
A	2,683	3,08	3,878	2,963	3,278	3,681	3,226	4,347	4,355	8,725
B	2,776	3,113	3,366	3,377	3,411	3,957	3,609	4,746	5,339	9,84
average	2,7295	3,0965	3,622	3,17	3,3445	3,819	3,4175	4,5465	4,847	9,2825
SD	0,0465	0,0165	0,256	0,207	0,0665	0,138	0,1915	0,1995	0,492	0,5575
%	100	113,4457	132,6983	116,1385	122,5316	139,9157	125,2061	166,569	177,5783	340,0806

Mikrotumamenetelmän numeeriset tulokset

Taulukko 7. Mikrotumamenetelmän tulostenkirjauslomake, jossa lasketut mikrotumalliset solut sekä CBPI-indeksit. Lasien koodit ovat liitteessä 4. Mikrotumanäytteet kerätty 29.8.2014.

	MIKROTUMAT						Tumien lkm/100 solua				Soluja laskettu 1000
Lasin koodi	1MN/solu	2MN/solu	3MN/solu	4MN/solu	buds	bridge	1-	2-	3-	4-	CBPI/MN
21A	1						4	87	6	3	2,05
21B	2						8	74	3	15	2,1
22A	5						13	72	9	6	2,02
22B	8	1					25	61	3	11	1,89
23A	4						14	78	4	4	1,94
23B	9	1			1		14	66	7	13	2,06
24A	5						17	75	4	4	1,91
24B	8						11	69	8	12	2,09
25A	6					1	26	70	3	1	1,78
25B	7	1					23	60	4	13	1,94
26A	8						19	75	5	1	1,87
26B	6					2	15	64	7	14	2,06
27A	8						21	75	4	0	1,83
27B	6					1	13	74	7	7	2,01
28A	9					1	17	75	8	0	1,91
28B	10	1					16	67	8	9	2,01
29A	11				2	1	21	72	7	0	1,86
29B	10						18	71	7	4	1,93
30A	9	1			1	1	80	20	0	0	1,2
30B	3						86	13	1	0	1,15